



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Estudo da seroprevalência referente à infeção por  
dengue da população da ilha da Madeira.**

**Ana Sofia Pinheiro de Jesus**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
PARASITOLOGIA MÉDICA**

**DEZEMBRO 2016**



**Universidade Nova de Lisboa**

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Estudo da seroprevalência referente à infeção por dengue da população da ilha da Madeira.**

**Autora:** Ana Sofia Pinheiro de Jesus

**Orientadora:** Professora Doutora Carla A. Sousa (UEIPM/IHMT/UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica

Apoio Financeiro de

DENFREE, Projeto do programa FP7-HEALTH (ref. 282378)



*“If your Nerve deny you,*

*Go above your Nerve.”*

*Emily Dickinson*

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, pelo esforço incessante para que conseguisse ter o percurso académico que sempre sonhei, à paciência demonstrada para me ouvirem durante todo o processo e principalmente pelo apoio quando as adversidades surgiram.

À minha orientadora Carla Sousa, pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento deste projeto e pela disponibilidade e paciência perante todas as minhas dúvidas. Agradeço por todos os conhecimentos que me transmitiu e me ter introduzido a área da Entomologia Médica e Controlo Vetorial.

Ao Gonçalo Seixas, o meu “co-orientador” e à Teresa Nazareth, a fonte de apoio do gabinete, cuja ajuda e disponibilidade constantes foram fundamentais para o término deste trabalho. Obrigada aos dois pelas gargalhadas para descomprimir (quem se consegue rir dos seus problemas, já ganhou) e os debates épicos no gabinete.

Ao Richard Paul e ao Phillipe Dussart, pelo acompanhamento e recomendações ao longo deste trabalho.

Ao IASAUDE, nomeadamente à enfermeira Ana Clara Silva, por toda a disponibilidade e ajuda que tornou possível o desenvolvimento de todo o trabalho desenvolvido na Madeira apesar dos obstáculos encontrados ao longo do caminho.

Aos laboratórios do Madeira Medical Centre e Henriques de Gouveia, nomeadamente à Dra. Susana Agostinho e ao Dr. Henriques de Gouveia por aceitarem que este estudo fosse realizado nos respetivos laboratórios e por se terem mostrado sempre disponíveis para tudo o que fosse necessário e um obrigada a todos os respetivos técnicos e enfermeiros que sempre se mostraram prestáveis e entusiastas na divulgação do estudo.

A todas as pessoas que acharam o trabalho interessante o suficiente para aceitarem participar neste estudo, pois sem dúvida que sem elas não teria tido tese.

Ao meu irmão que sempre se mostrou interessado em saber os desenvolvimentos deste trabalho e sempre me apoiou em tudo (e também muito me aturou, lá para a irmã mais velha chata!). Daqui a uns anos és tu!

À Ana Lúcia (sem dúvida que as Ana's funcionam muito bem), pela amizade, pela motivação e interesse pelo meu trabalho que sempre demonstraste, digamos, desde miúdas.

E a ti, Rui, incansável desde o início até ao fim, fonte de força quando esta faltava, por todo o apoio que me deste ao longo desta jornada, pela presença constante mesmo quando ausente. Sem dúvida que foste o motor para que a máquina funcionasse a todo o vapor. Obrigada. Venha o resto das nossas vidas!

## RESUMO

A febre da dengue é causada por um *Flavivirus* e é transmitida por mosquitos do género *Aedes*. Estima-se que haja cerca de 50 a 100 milhões de infeções por ano, das quais 80% são assintomáticas. Após a introdução de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) na Ilha da Madeira, um surto de dengue foi declarado em Outubro de 2012 com um total de 2.168 de casos prováveis, dos quais 1.080 foram confirmados laboratorialmente. Baseada na percentagem de 80% de casos assintomáticos, o impacto da doença pode ser estimado em cerca de 5.400 infeções humanas. Assim, os objetivos do nosso trabalho foram: (i) realizar o primeiro estudo da seroprevalência na Ilha da Madeira após o surto, (ii) determinar a viabilidade da saliva para a deteção de imunoglobulinas G (IgG) anti-dengue com o “kit” Panbio®; e; (iii) testar um novo teste de ELISA “in-house” criado pelo “Institut Pasteur” para a deteção de IgG em soro e saliva.

Soro e saliva foram colhidos de 355 participantes com idades superiores a dez anos. Durante a colheita, realizou-se um inquérito referente a indicadores pessoais, como a idade, género, peso, se viajou para países endémicos, se possui a vacina da febre-amarela e concelho de residência. Realizou-se o teste de ELISA indireto para IgG Panbio® e as infeções secundárias foram determinadas com o ELISA Capture para IgG Panbio®.

Das amostras de soro testadas, observaram-se 32 resultados positivos. Estas foram também testadas com o “kit” de ELISA Capture para IgG, obtendo-se um resultado de cinco amostras positivas para infeções secundárias recentes. O “kit” de ELISA indireto para IgG não demonstrou resultados promissores para a deteção de IgG anti-dengue nas amostras de saliva. Nenhum dos indicadores pessoais demonstrou diferenças estatisticamente significativas no que se refere à percentagem de participantes seropositivos. O “kit” de ELISA “in-house” obteve uma sensibilidade e especificidade para soro de 72% (IC 95%: 53%-86%) e 89% (IC 95%: 74%-97%) respetivamente, e uma sensibilidade e especificidade para saliva de 19% (IC 95%: 7%-36%) e 92% (IC 95%: 78-99%), respetivamente.

Com estes resultados é possível estimar que cerca de 19.000 pessoas foram afetadas pelo surto de dengue na Ilha da Madeira, uma proporção quase quatro vezes mais alta do que a estimada com base numa proporção de 80% de casos assintomáticos. A presença de amostras com resultados positivos para prováveis infeções secundárias em indivíduos que não viajaram para países endémicos de dengue sublinha a importância da vigilância epidemiológica de dengue e a necessidade de estratégias de controlo do mosquito como fatores chave para a prevenção de futuros surtos.

**Palavras-chave:** Dengue, seroprevalência, Ilha da Madeira

## ABSTRACT

Dengue fever is a vector-borne disease that has spread rapidly throughout the world. It is caused by a *Flavivirus* and transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*. There are an estimated 50 to 100 million infections per year, in more than 100 endemic countries, of which 80% are asymptomatic. Seven years after the introduction of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) in Madeira, a dengue outbreak was declared in October 2012 with a total of 2,168 probable cases of which 1,080 were confirmed. Thus, based on the threshold of 80% asymptomatic cases, the overall impact of the outbreak can be estimated in *circa* 5,400 human infections.

Our study aims to: (i) perform the first seroprevalence survey in Madeira Island after the outbreak: (ii) assess the usefulness of saliva for dengue immunoglobulin G (IgG) detection with Panbio® “kit” and: (iii) to test a new ELISA “in-house” for IgG detection in serum and saliva samples created by “Institut Pasteur”.

Serum and saliva samples were collected from 355 participants with ages over 10 years old. During the sample collection, an inquiry was conducted about personal indicators such as age, gender, weight, if the participant travelled abroad, if the participant has yellow-fever vaccine and residency county. Anti-dengue IgG detection was carried-out with a commercial “kit” -IgG indirect ELISA, Panbio® and secondary infections determined by IgG Capture ELISA “kit” (Panbio®). Regarding serum samples, we observed 32 positive results. Positive samples were also tested with IgG Capture ELISA “kit” showing that five samples are positive for recent secondary infections. Immunoglobulin G indirect ELISA showed no promising results for dengue antibody detection in saliva samples. None of the personal indicators showed statistical significant differences regarding participants seropositivity. The “in-house” ELISA “kit” obtained a sensitivity and specificity for serum samples of 72% (IC 95%: 53%-86%) and 89% (IC 95%: 74%-97%) respectively and a sensitivity and specificity for saliva samples of 19% (IC 95%: 7%-36%) e 92% (IC 95%: 78-99%) respectively.

These results suggest that *circa* 19,000 people were affected by 2012’s dengue outbreak in Madeira Island, an estimate almost four times higher than the initial expected based on the threshold of 80% asymptomatic cases. The presence of probable secondary infections in individuals that have not travelled for dengue endemic countries highlights the importance of dengue surveillance and mosquito control strategies as a key factor to prevent future outbreaks.

**Keywords:** Dengue, serosurvey, Madeira Island

# Índice Geral

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Dengue .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Caracterização do vírus da dengue .....	2
1.1.2. Distribuição geográfica da dengue .....	3
1.1.3. Serotipos .....	3
<b>1.2. <i>Flavivirus</i> registados em Portugal.....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Em Portugal continental .....	6
1.2.2. No arquipélago da Madeira .....	7
1.2.2.1. <i>Aedes aegypti</i> na ilha da Madeira .....	7
1.2.2.2. Dengue na ilha da Madeira .....	8
<b>1.3. Desenvolvimento da doença e sintomatologia.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Métodos de deteção e diagnóstico .....</b>	<b>12</b>
1.4.1. Métodos diretos .....	12
1.4.2. Métodos indiretos .....	14
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Materiais e métodos.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Amostragem.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Colheita das amostras biológicas .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3. Protocolo ELISA “in-house” .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4. Tratamento estatístico .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5. Aspetos éticos.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Apresentação e análise de resultados.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Estudo da seroprevalência.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2. Teste de ELISA indireto para IgG para saliva.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3. Teste ELISA “Capture” para IgG.....</b>	<b>35</b>



4.4. Teste ELISA “in-house” .....	37
4.5. Extrapolação dos resultados do inquérito serológico para a população da Região Autónoma da Madeira .....	41
5. Discussão .....	43
5.1. Estudo da seroprevalência.....	43
5.2. Teste ELISA “Capture” para IgG.....	47
5.3. Teste ELISA “in-house” .....	48
6. Conclusão .....	49
7. Referências bibliográficas.....	52
Anexo I.....	63
Anexo II .....	66
Anexo III.....	67

# Índice de gráficos e tabelas

## Gráficos:

<b>Gráfico 1</b> - Distribuição das amostras testadas no ELISA indireto da Panbio® pelas faixas etárias. ....	28
<b>Gráfico 2</b> - Regressão linear entre as amostras positivas e a distribuição das mesmas por faixa etária. ....	29
<b>Gráfico 3</b> - Representação gráfica da distribuição dos participantes pelas faixas etárias e género.....	29
<b>Gráfico 4</b> - Distribuição dos participantes seropositivos consoante o peso.....	30
<b>Gráfico 5</b> - Representação gráfica da distribuição da proporção de participantes seropositivos e seronegativos pelo fator “viajou/não viajou para países endémicos”....	30
<b>Gráfico 6</b> - Representação gráfica da distribuição das amostras consoante o fator “tem vacina da febre-amarela/não tem vacina da febre-amarela”. ....	31
<b>Gráfico 7</b> - Representação gráfica da distribuição dos participantes pelos concelhos de residência. ....	32
<b>Gráfico 8</b> - Representação gráfica da distribuição do “index-value” do ELISA indireto para IgG consoante as amostras positivas.....	36
<b>Gráfico 9</b> - Representação gráfica da distribuição do “index-value” da ELISA Capture para IgG das amostras identificadas como positivas no ELISA indireto para IgG da PanBio®.....	36
<b>Gráfico 10</b> - Representação gráfica da distribuição dos resultados das amostras testadas comparando os resultados do soro no teste comercial indireto da PanBio® para IgG com os resultados do soro no teste ELISA “in-house”.....	40
<b>Gráfico 11</b> - Representação gráfica da distribuição dos resultados das amostras testadas comparando os resultados do soro no teste comercial indireto da PanBio® para IgG com os resultados da saliva no teste ELISA “in-house”.....	40

## Tabelas:

<b>Tabela 1</b> - Distribuição da amostra populacional esperada por género e por faixa etária. ....	23
<b>Tabela 2</b> - Distribuição da amostra populacional obtida por género e por faixa etária. 27	

<b>Tabela 3</b> - Distribuição do número total das amostras e das amostras com resultado positivo por concelho de residência. ....	32
<b>Tabela 4</b> - Distribuição das amostras seropositivas em relação à amostra total para todos os indicadores analisados. ....	34
<b>Tabela 5</b> - Distribuição das amostras positivas do teste ELISA indireto relativamente às respetivas amostras de saliva. ....	35
<b>Tabela 6</b> - Distribuição das amostras positivas e negativas obtidas no teste ELISA indireto para IgG e as amostras de soro do teste ELISA “in-house”. ....	39
<b>Tabela 7</b> - Distribuição das amostras positivas e negativas obtidas no teste ELISA indireto para IgG e as amostras de saliva testadas no teste ELISA “in-house”. ....	39
<b>Tabela 8</b> - Estimativa do número de indivíduos potencialmente seropositivos para vírus da dengue na população da Ilha da Madeira, para cada faixa etária e para cada género. ....	42

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Distribuição do número de casos de dengue e o número de países afetados consoante o tempo (Adaptado de <a href="http://www.denguevirusnet.com/history-of-dengue.html">http://www.denguevirusnet.com/history-of-dengue.html</a> acedido a 23 Agosto 2016). .....	1
<b>Figura 2</b> - Estrutura de uma partícula viral do vírus da dengue. (Adaptado de <a href="http://Viralzone.expasy.org">Viralzone.expasy.org</a> acedido a 19 Maio 2016). .....	2
<b>Figura 3</b> - Representação do genoma do vírus da dengue. As regiões codificantes codificam três proteínas estruturais (a cápside (C), membrana (M) e glicoproteínas do invólucro (E)) e sete outras proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Guzman <i>et al.</i> , 2010). .....	2
<b>Figura 4</b> - Distribuição de dengue em 2014. (Guzman <i>et al.</i> , 2015). .....	3
<b>Figura 5</b> - Expansão global dos serotipos de dengue: (A) 1970 e (B) 2011 (Adaptado de Gubler, 2011). .....	4
<b>Figura 6</b> - Árvore filogenética de estirpes de DENV de todos os quatro serotipos com base nas regiões codificantes disponíveis na biblioteca do GenBank (Weaver e Vasilakis, 2009). .....	5
<b>Figura 7</b> - Modelo de uma reação ADE aquando infeção por vírus da dengue. (Whitehead <i>et al.</i> , 2007). .....	6
<b>Figura 8</b> - Distribuição de casos confirmados por vírus Zika nas Américas na epidemia iniciada em 2015 (OMS, 2016). .....	8
<b>Figura 9</b> – Incidência cumulativa de casos prováveis de dengue por freguesia no Arquipélago da Madeira durante o surto de 2012 (retirado de <a href="http://doc.iasaude.pt/mosquito/attachments/article/35/1-Boletim%20Epi%20Dengue%20week%202010-2013_5-2014.pdf">http://doc.iasaude.pt/mosquito/attachments/article/35/1-Boletim%20Epi%20Dengue%20week%202010-2013_5-2014.pdf</a> acedido a 25 Agosto 2016). .....	9
<b>Figura 10</b> - Infeções por dengue e sintomatologia da doença em pirâmide. (Kyle e Harris, 2008) com os dados obtidos da European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (adaptado de: <a href="http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/dengue_fever/factsheet-for-health-professionals/Pages/Factsheet_health_professionals.aspx">http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/dengue_fever/factsheet-for-health-professionals/Pages/Factsheet_health_professionals.aspx</a> acedido a 7 Setembro 2016). .....	11

<b>Figura 11</b> - Resposta imunitária numa infeção primária por dengue (adaptado de Guzman <i>et al.</i> , 2010).....	15
<b>Figura 12</b> - Os títulos de IgM e IgG variam consoante se a infeção é primária ou secundária (adaptado a partir de documentação PanBio 2014). .....	15
<b>Figura 13</b> - Representação da organização da placa no final do protocolo do teste de ELISA indireto para IgG (fotografia da autora). .....	28
<b>Figura 14</b> - Mapa com a distribuição geográfica do local de residência dos participantes seropositivos pela Ilha da Madeira. ....	33
<b>Figura 15</b> - Representação da placa e seu aspeto final após teste IgG Capture (fotografia da autora). .....	37
<b>Figura 16</b> - Representação da organização e aspeto geral da placa no final do procedimento do ELISA “in-house” (fotografia da autora).....	37

## **Siglas e abreviaturas**

**ADE** - *Antibody-Dependent Enhancement*

**cDNA** – DNA complementar

**DNA** – *Deoxyribonucleic Acid*

**DENV** – Vírus da dengue

**DGS** – Direção Geral de Saúde

**ELISA** - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

**E.U.A.** – Estados Unidos da América

**Fc $\gamma$**  - Fragmento cristalizável  $\gamma$

**IASaude** - Instituto de Administração da Saúde e Assuntos Sociais

**INE** – Instituto Nacional de Estatística

**Ig** – Imunoglobulina

**IHMT** – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**kdr** – resistência knockdown

**M** - molar

**mtDNA** – DNA mitocondrial

**NAAT** - *Nucleic Acid Amplification Testing*

**nm** - nanómetros

**NS1** – proteína não estrutural 1

**PBS** - *Phosphate Buffered Saline*

**PBS-T** – PBS com Tween 20

**PBS-T-NDM** – PBS com Tween 20 e leite magro em pó

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*

**PRNT** - *Plaque reduction neutralization test*

**RAM** – Região Autónoma da Madeira

**RNA** - *Ribonucleic Acid*

**RT-PCR** – PCR de transcriptase reversa

**TMB** - *Tetra Methyl Benzidine*

**UNL** – Universidade Nova de Lisboa

**WHO** – *World Health Organization*

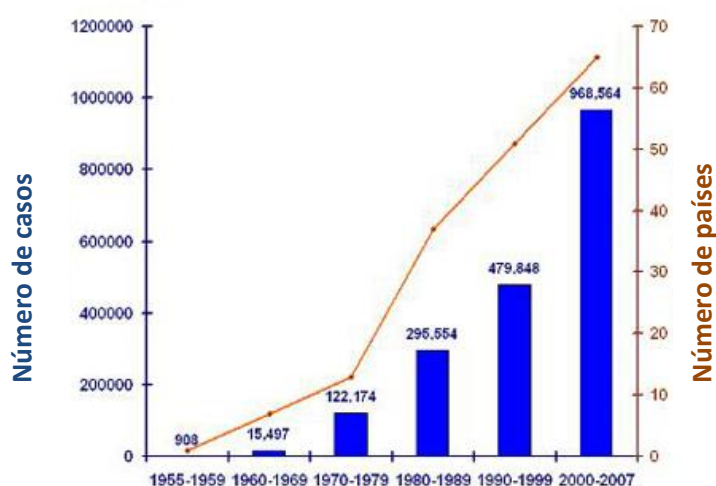
**$\mu$ L** - Microlitro

# 1. Introdução

## 1.1.1. Dengue

A febre da dengue é uma patologia que tem vindo a emergir numa forma acelerada em diversas partes do Mundo. Esta doença é causada por um arbovírus (vírus transmitido por artrópodes) pertencente ao género *Flavivirus*, género ao qual também pertencem os arbovírus da febre-amarela, vírus do Nilo ocidental e da encefalite japonesa. A origem da palavra “dengue” não é clara, mas pensa-se que deriva da frase suaili “Ka-dinga pepo”, que significa doença provocada por um espírito do mal.

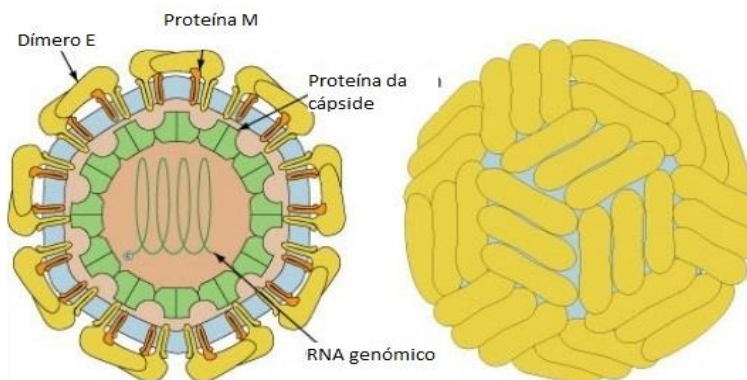
O primeiro registo de um caso provável de febre da dengue encontra-se numa enciclopédia médica chinesa da dinastia Jin (265–420 DC) referido como “água envenenada” associada a insetos voadores. As primeiras epidemias de dengue reconhecidas ocorreram quase em simultâneo na Ásia, África e América do Norte, na década de 1780. O primeiro caso confirmado data de 1789 registado por Benjamin Rush, que associou o nome febre “breakbone” a esta patologia devido aos sintomas de mialgia e artralgia observados no paciente. No século XX foi identificado o agente etiológico da doença como sendo um vírus e a sua transmissão associada a mosquitos. Atualmente cerca de 2,5 biliões de pessoas, ou cerca de 40% da população mundial, vive em áreas onde há risco de transmissão de dengue, dado que o número de casos e de países com o vírus em circulação têm vindo a aumentar (figura 1).



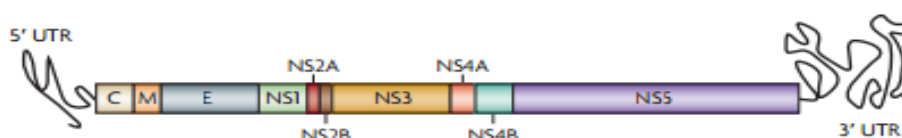
**Figura 1** – Distribuição do número de casos de dengue e o número de países afetados consoante o tempo (Adaptado de <http://www.denguevirusnet.com/history-of-dengue.html> acedido a 23 Agosto 2016).

### 1.1.1 Caracterização do vírus da dengue

A partícula viral madura do vírus da dengue é esférica com um diâmetro de 50nm; contém múltiplas cópias de três proteínas estruturais, uma membrana com duas camadas e genoma de RNA de cadeia simples, com polaridade positiva e aproximadamente 11kb (ver figura 2). O genoma contém RNA codificante para sete proteínas não estruturais e três proteínas estruturais: cápside (C), pré-membrana/membrana (prM/M), uma grande glicoproteína (E) (ver figura 3). A glicoproteína E está associada à ligação do vírus ao anticorpo, fusão da membrana viral com a celular, tropismo celular e a indução duma resposta imune protetora do tipo humoral. Esta glicoproteína forma homodímeros na superfície de viriões e é constituída por três domínios: um central  $\beta$ , com forma de barril (domínio I: ED1), uma região alongada de dimerização (domínio II: ED2) e uma região tipo imunoglobulina C-terminal (domínio III: ED3). O domínio ED3 contém os epítomos que são reconhecidos por anticorpos como os anticorpos neutralizantes (Matsui *et al.*, 2010 e Guzman *et al.*, 2010). Sendo um arbovírus, é transmitido por artrópodes, mais especificamente pela picada de fêmeas de culicídeos infetados do género *Aedes*, sendo o principal vetor a espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).



**Figura 2** - Estrutura de uma partícula viral do vírus da dengue. (Adaptado de Viralzone.expasy.org acessado a 19 Maio 2016).

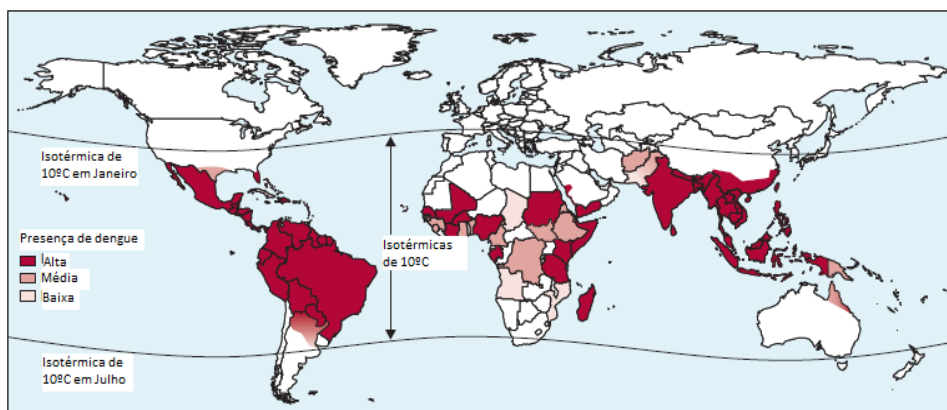


**Figura 3** - Representação do genoma do vírus da dengue. As regiões codificantes codificam três proteínas estruturais (a cápside (C), membrana (M) e glicoproteínas do invólucro (E)) e sete outras proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Guzman *et al.*, 2010).



### 1.1.2. Distribuição geográfica da dengue

A distribuição desta patologia, como se observa na figura 4, predomina entre duas linhas isotérmicas em que a temperatura mínima é de 10°C (entre o paralelo 45°N e o 35°S (Guzman *et al.*, 2015)). Estando desta forma distribuída, a dengue é uma das doenças que causa maior preocupação a nível global, sabendo-se que afeta entre 50 a 100 milhões de pessoas por ano em mais de 100 países endémicos (WHO, 2009). A nível global, doenças transmitidas por artrópodes são um grande problema de saúde e algumas são vistas como emergentes. O problema agrava-se uma vez que a dispersão de algumas destas patologias beneficia com o aumento do intercâmbio entre países endémicos e não endémicos e com o aumento geral da temperatura. Assim, a dengue é uma doença infecciosa, que atualmente representa um risco, que até recentemente, não existia em países com um clima mais temperado.



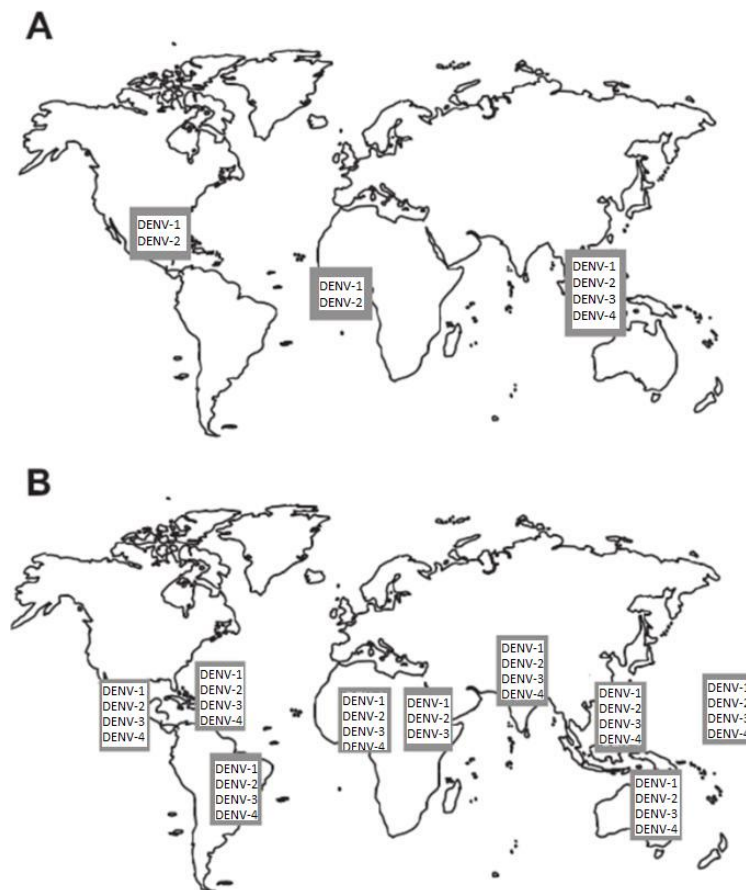
**Figura 4** - Distribuição de dengue em 2014. (Guzman *et al.*, 2015).

Esta patologia tem também uma distribuição preferencial por zonas urbanas e subúrbios onde ocorrem elevado número de criadouros do respetivo vetor (geralmente recipientes peri-domésticos como o prato de um vaso, pneus abandonados, latas e garrafas) e elevadas densidades populacionais do seu hospedeiro preferencial em ciclo urbano, os humanos (Powell *et al.*, 2013).

### 1.1.3. Serotipos

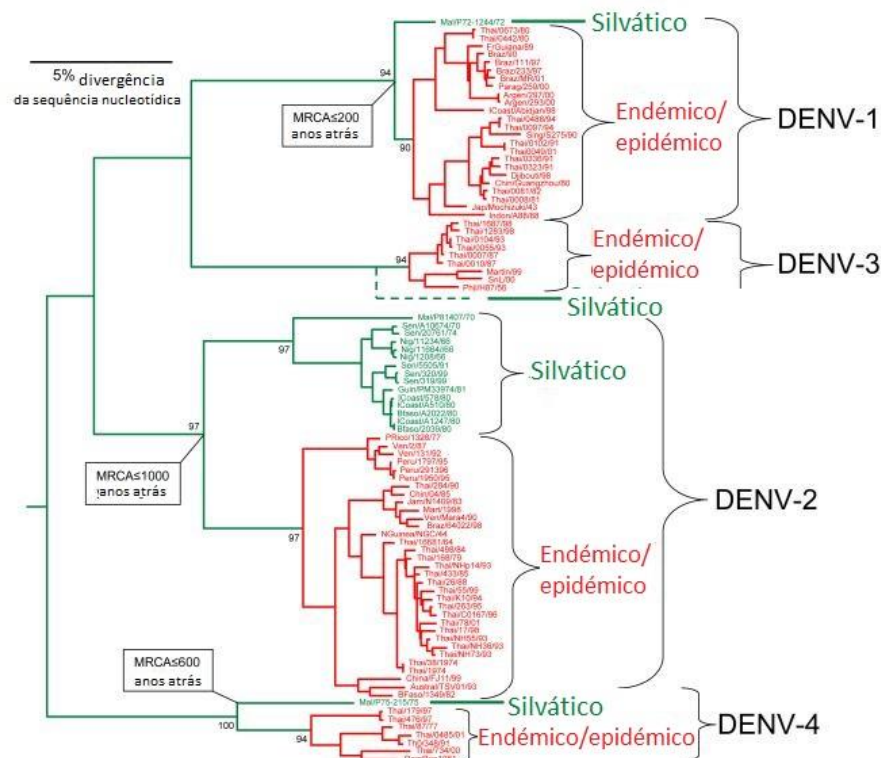
Serotipos são grupos dentro de uma espécie de microorganismos (desde bactérias a vírus) que partilham estruturas de superfície (antígenos) distintos. O vírus da dengue, em particular, possui cinco serotipos diferentes: DENV-1, DENV-2, DENV-

3, DENV-4 (ver figura 5) e DENV-5, apesar deste último ainda só estar descrito em ciclo silvático e ainda não haver consenso entre os investigadores sobre a sua existência. Para além desta diversidade de serotipos, para cada serotipo existem genótipos distintos, demonstrando ser um vírus com elevada variabilidade genética (Weaver e Vasilakis, 2009).



**Figura 5** - Expansão global dos serotipos de dengue: (A) 1970 e (B) 2011 (Adaptado de Gubler, 2011).

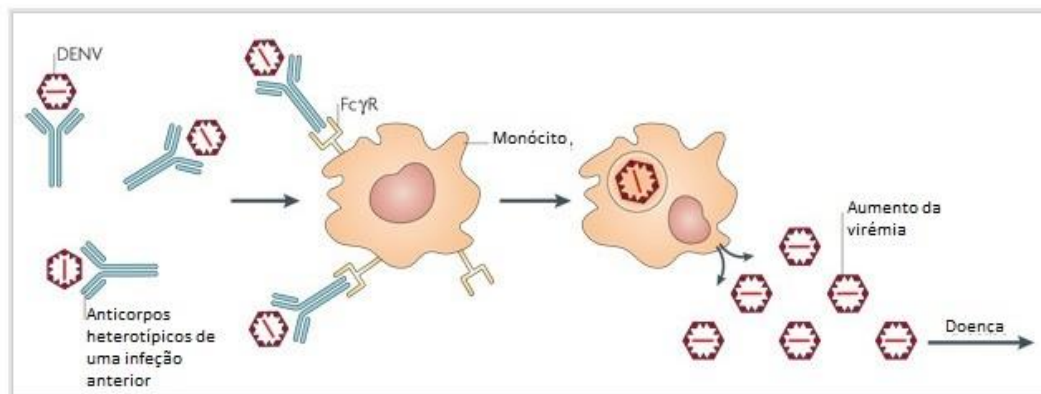
A análise filogenética efetuada com base em diferenças nucleótídicas de diferentes vírus confirma a sua diferenciação em grupos distintos, sobreponíveis à sua distribuição pelos diferentes serotipos (figura 6).



**Figura 6** - Árvore filogenética de estirpes de DENV de todos os quatro serotipos com base nas regiões codificantes disponíveis na biblioteca do GenBank (Weaver e Vasilakis, 2009).

A obtenção de uma vacina para este vírus apresenta grandes desafios uma vez que este vírus pode provocar uma reação ADE (Antibody-Dependent Enhancement) (figura 7). Esta reação passa pela primeira exposição do hospedeiro ao vírus de um determinado serotipo ou ao vírus Zika que provoca uma produção de anticorpos IgG homotípicos e heterotípicos (estes últimos associados à imunização para todos os serotipos num período de cerca de seis meses após a infecção primária). A longo prazo, os anticorpos homotípicos continuarão em circulação, ao passo que os anticorpos heterotípicos começarão a diminuir. Aquando uma infecção secundária por um serotipo diferente, os anticorpos heterotípicos produzidos na primeira infecção vão se ligar ao vírus, mas não o conseguirão neutralizar. Em vez disso o complexo anticorpo-vírus ligar-se-á aos recetores Fcγ (fragmento cristalizável γ) de monócitos circulantes. Os anticorpos, uma vez ligados mas sem neutralizar o vírus, facilitam a entrada do mesmo para o interior dos monócitos, e este replica-se. Esta reação provocará um aumento exacerbado da produção de citocinas por parte dos monócitos, o que levará a uma sintomatologia mais grave numa infecção secundária assim como haverá um aumento da taxa de replicação

do vírus e portanto uma maior virémia nas infeções secundárias (Whitehead *et al.*, 2007). Sabendo isto, torna-se claro que, para a obtenção de uma vacina eficaz contra a dengue, esta tem que abranger todos os serotipos deste flavivírus de forma a neutralizar esta reação, ou pelo menos, minimizar os seus efeitos.



**Figura 7** - Modelo de uma reação ADE aquando infecção por vírus da dengue. (Whitehead *et al.*, 2007).

## 1.2. *Flavivirus* registados em Portugal

### 1.2.1. Em Portugal continental

Em Portugal continental, flavivírus transmitidos por mosquitos que provocam doença em humanos de que já houve registo, englobam o vírus da febre-amarela e o da febre do vírus do Nilo ocidental (Almeida, 2011). Surtos de febre-amarela eram comuns em vários portos marítimos europeus e a última epidemia de que existe registo em Lisboa ocorreu em 1857, tendo-se registado 1800 casos dos quais 1/3 foram fatais. O vetor seria muito provavelmente *Aedes aegypti*. No entanto, esta espécie, já apontada por Carlos Finlay, em 1881, como a possível transmissora do agente etiológico desta doença, só foi formalmente identificada, como vetora desta arbovirose, em 1900, pela comissão científica do Exército dos EUA em Cuba, chefiada por Walter Reed (Brès, 1987). *Aedes aegypti* foi detetado em Portugal continental e esta espécie foi considerada abundante na área de Lisboa (Sarmiento *et al.*, 1902 retirado de Almeida 2011), onde foi assinalada pela última vez em 1956 (Costa *et al.*, 1956). Em prospeções posteriores efetuadas por todo o território continental, não voltou a ser encontrada, até à data (Ribeiro *et al.*, 1988 e Almeida *et al.*, 2008).

A circulação do vírus do Nilo ocidental foi detetada nas décadas de 60-70 do século XX através de estudos serológicos efetuados em cavalos (29%) e humanos (3%), após um surto epizootico de encefalomielite na zona de Beja (Filipe *et al.*, 1969, 1973 e 1990). O vírus foi isolado em 1971 em mosquitos do complexo *An. maculipennis* (Filipe *et al.*, 1972), muito provavelmente da espécie *An. atroparvus* (Ribeiro *et al.*, 1988), capturados na zona de Beja. Foi também detetado num lote de fêmeas, não alimentadas, desta mesma espécie, capturadas no estuário do Tejo, em 1996 (Fernandes *et al.*, 1998). No Verão de 2004, duas pessoas com síndrome meníngeo provocado por vírus do Nilo ocidental, foram putativamente infetadas na zona da Ria Formosa (Connel *et al.*, 2004), ao que se seguiu o isolamento deste vírus em mosquitos *Culex pipiens* e *Cx. univittatus* capturados na mesma zona e com taxa mínima de infeção conjunta de 2,8/1000 (Esteves *et al.*, 2005). A sequenciação do genoma destes isolados virais e a sua comparação com o anterior isolado de 1971, revelou tratar-se de uma nova introdução (Parreira *et al.*, 2007), pertencendo a uma linhagem filogenética de vírus circulantes na bacia do Mediterrâneo desde o fim dos anos 90 (Zeller *et al.*, 2004).

### **1.2.2. No arquipélago da Madeira**

No arquipélago da Madeira ocorrem alguns conhecidos vetores de flavivírus como *Culex pipiens* mas até 2012 não havia registo de circulação de arbovírus patogénicos para o homem. A situação entomológica da ilha alterou-se em 2005 com o registo da presença de uma espécie até então nunca assinalada no arquipélago.

#### **1.2.2.1. *Aedes aegypti* na ilha da Madeira**

A presença de *Aedes aegypti* na ilha da Madeira foi reconhecida em 2005, no Concelho do Funchal, depois desta espécie ter desaparecido do território continental em 1956 (Holstein, 1967; Ribeiro *et al.*, 1988). Desde então, a espécie tem vindo a expandir-se em toda a costa sul da ilha (Gonçalves *et al.*, 2008). Estudos genéticos sugerem que a espécie *Ae. aegypti* presente na ilha poderá ter origem na América Latina, nomeadamente no Brasil ou na Venezuela. Esta ideia é suportada pela análise genética de DNA mitocondrial (mtDNA) e polimorfismos genéticos associados à resistência knockdown (kdr) (Seixas *et al.*, 2013). Esta espécie tem vindo a aumentar a sua distribuição geográfica; originária de África, esta, primeiramente, expandiu-se

Recentemente, na América Central e América do Sul, uma epidemia de vírus Zika (figura 8), com início em 2015 que ainda se mantém em 2016, tem gerado grande preocupação uma vez que se verificou uma elevada taxa de microcefalias graves em recém-nascidos, associada à presença do vírus nas mães ao longo da gestação, aumentando assim a premência que existe em eliminar/controlar este vetor (Musso *et al.*, 2015; WHO, 2016).



#### 1.2.2.2. Dengue na ilha da Madeira

8



*et al.*, 2013)) ocorreu na Ilha da Madeira com o registo de 2168 casos prováveis de febre de dengue. O surto afetou principalmente residentes de três municípios: 77% dos casos localizaram-se no município do Funchal, 8% em Santa Cruz, 6% em Câmara de Lobos e 9% nos restantes oito municípios (EDCD, 2016)). Dos 2168 casos prováveis, 1084 (50%) foram confirmados laboratorialmente (DGS, 2013).

De acordo com os dados referentes ao número de casos prováveis de dengue até 25 de Novembro de 2012 (n=1891), 41,1% (777) dos casos ocorreram em homens e 58,9% (1114) ocorreram em mulheres com um rácio homem/mulher de 0,69. O grupo etário dos 25-64 anos, com uma mediana de idades de 39 anos, foi o mais afetado, observando-se um maior número de casos de doença no sexo masculino dos 0 aos 20 anos e no sexo feminino dos 30 aos 65 anos, distribuição aleatória dado que a picada do mosquito se deveu provavelmente a picadas oportunas. Na maioria dos casos, os sintomas foram ligeiros, com febre, mialgias, cefaleias e artralgias, tendo ocorrido 128



**Figura 9** – Incidência cumulativa de casos prováveis de dengue por freguesia no Arquipélago da Madeira durante o surto de 2012 (retirado de [http://doc.iasaude.pt/mosquito/attachments/article/35/1-Boletim%20Epi%20Dengue%20week%2010-2013\\_5-2014.pdf](http://doc.iasaude.pt/mosquito/attachments/article/35/1-Boletim%20Epi%20Dengue%20week%2010-2013_5-2014.pdf) acedido a 25 Agosto 2016).

### **1.3. Desenvolvimento da doença e sintomatologia**

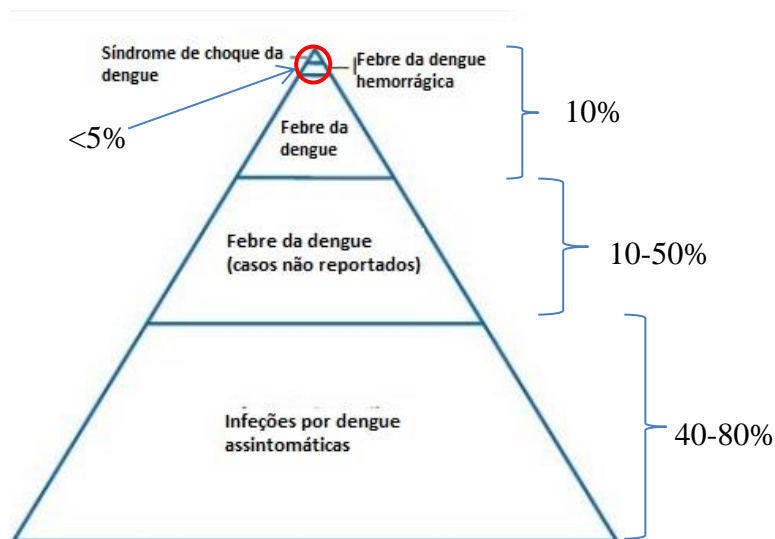
Após um período de incubação que varia, normalmente, entre os quatro e os 12 dias, a infecção por qualquer um dos serotipos do DENV pode dar origem a um quadro clínico que engloba sintomatologia diversa, com uma evolução clínica difícil de prever. Ainda que a maioria das infecções não seja sintomática e se mantenha subclínica, grande parte daquelas em que se registam manifestações clínicas, normalmente incluem febre elevada (39-40°C), mialgias intensas, cefaleias, dor retro-orbital, dores ósseas, artralgias e astenia intensa; não são infrequentes sintomas gastrointestinais como náuseas e vômitos, dores abdominais e diarreia. A partir do 3º dia da doença pode surgir um exantema cutâneo (semelhante ao da rubéola), que pode levar ao aparecimento de prurido intenso, principalmente nas palmas das mãos e plantas dos pés. Com a continuação do quadro febril é possível encontrar sinais de hipotensão postural, e, inclusive, fenómenos hemorrágicos localizados e limitados. A febre pode manter-se entre três e sete dias, mas os sinais e sintomas, sobretudo os osteoarticulares e a astenia, podem continuar durante várias semanas. Este quadro clínico, autolimitado e sem complicações graves, designa-se por febre da dengue ou dengue sem complicações. O tratamento para a febre da dengue baseia-se no suporte do doente: a hidratação oral (com água, soro caseiro, água de coco), ou endovenosa, se necessário, e a redução da febre é fundamental, sendo este tratamento indicado em todos os casos. O paracetamol é o medicamento de primeira linha como antipirético e antiálgico. O ácido acetilsalicílico e derivados, assim como os anti-inflamatórios não esteroides, estão contraindicados pela sua possível interferência com os mecanismos da coagulação; a dipirona deve ser utilizada com algum cuidado por poder provocar hipotensão, agravando os quadros de hipotensão postural nalguns doentes com dengue (2º Congresso Nacional de Medicina Tropical, 2013).

Uma pequena percentagem de indivíduos infetados (<5%), pode ter uma evolução clínica com características graves. O quadro clínico resulta da perda de plasma, acompanhada, ou não, de manifestações hemorrágicas, com possível evolução para choque hipovolémico, incluindo-se estas manifestações severas de dengue num conceito único de dengue grave (WHO, 2012). Os sintomas e sinais iniciais variam desde a suscetibilidade aumentada para hemorragias – diagnosticada pela prova do garrote – até às manifestações hemorrágicas espontâneas de pele (equimoses, petéquias)



e mucosas (nasais, gengivais), aumento do fluxo menstrual e sangramento urinário; com a evolução da doença, surgem derrames pleural, peritoneal e/ou pericárdico, redução da pressão arterial, do fluxo urinário e do enchimento capilar, pulso fino e rápido, palidez, extremidades frias, sudorese, sonolência, que terminam no estabelecimento do choque, com o desaparecimento do pulso palpável, ausência de diurese, coma e, finalmente, morte. A mortalidade dos casos de choque associado à dengue varia entre 10 e 50%, dependendo dos estudos. Para estes indivíduos está apenas disponível terapêutica de suporte, mas esta pode diminuir o número de fatalidades para menos de 1% dos casos clínicos graves (WHO, 2009).

Crê-se que o número de casos confirmados na Ilha da Madeira durante o surto esteja subestimado uma vez que cerca de 80% dos casos de dengue são assintomáticos (Bhatt *et al.*, 2013) mas esta percentagem pode variar entre 40 a 80% (figura 10). É de interesse perceber a real dimensão deste surto uma vez que será com base nesta estimativa que poderemos obter uma noção: (i) acerca da possibilidade de ocorre um novo surto de doença provocado por DENV-1, e do (ii) possível impacte da introdução de um novo serotipo, nomeadamente no que se refere à proporção de potenciais casos de dengue grave. Desta forma é fundamental um estudo epidemiológico nesta área geográfica para se perceber a dimensão do surto de 2012-13.



**Figura 10** - Infecções por dengue e sintomatologia da doença em pirâmide. (Kyle e Harris, 2008) com os dados obtidos da European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (adaptado de: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/dengue\\_fever/factsheet-for-health-professionals/Pages/Factsheet\\_health\\_professionals.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/dengue_fever/factsheet-for-health-professionals/Pages/Factsheet_health_professionals.aspx) acedido a 7 Setembro 2016).

#### **1.4. Métodos de detecção e diagnóstico**

Os métodos diretos de detecção e diagnóstico identificam a presença do vírus e outros produtos produzidos na presença do mesmo na corrente sanguínea, ao passo que os métodos indiretos passam pela detecção de anticorpos contra o vírus da dengue, sendo estes menos sensíveis e específicos que os diretos, podendo dar origem a falsos positivos e negativos (Peeling *et al.*, 2010).

##### **1.4.1. Métodos diretos**

Os métodos diretos de detecção e diagnóstico de dengue são todos aqueles que procuram o vírus ou compostos do mesmo, seja pela detecção de material genético pelo método de RT-PCR, pela detecção da proteína não estrutural NS1 ou isolamento do vírus em cultura de células.

##### Isolamento viral

O vírus da dengue pode ser isolado por inoculação de amostras por diagnosticar em mosquitos, cultura de células ou inoculação intracerebral em ratinhos. A partir do sangue na sua totalidade, soro ou plasma, que é colhido de pacientes durante a fase aguda da doença ou dos tecidos em casos mortais (o vírus da dengue já foi isolado no fígado, baço, nódulos linfáticos e noutros tecidos) é possível isolar-se o vírus da dengue. Está comprovado que as taxas de isolamento do vírus são consideravelmente maiores no sangue completo do que as taxas de isolamento no soro ou plasma (Klungthong *et al.*, 2007). Para a identificação do serotipo do vírus, testes de imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais específicos para cada serotipo é o que é utilizado mais comumente.

##### Cultura de células

O vírus da dengue pode ser isolado através de cultura de células (utilizando linhagens celulares de mosquito, como a C6/36 e AP61 ou linhagens celulares de mamíferos, como as células Vero e LLc-MK2). Utilizando-se a linhagem de células de mosquito C6/36, por exemplo, inicia-se uma cultura *in vitro* com a amostra a analisar para isolamento do vírus. Se presente, este replica-se nas células C6/36, uma vez que estas células são propensas à infecção viral (White, 1987), até os títulos de

vírus se tornarem altos o suficiente de forma a este ser detetado devido aos efeitos citopáticos provocados.

#### Deteção do RNA viral

O RNA viral da dengue pode ser detetado utilizando um teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT) em tecidos, sangue completo ou soro retirado de pacientes durante a fase aguda da doença. Vários protocolos têm vindo a ser desenvolvidos para identificar os vírus da dengue usando “primers” que reconhecem no genoma viral regiões específicas dos diferentes serotipos do vírus, como por exemplo a técnica de RT-PCR descrita por Johnson *et al.* (2005). Técnicas de “nested-PCR” melhoram a sensibilidade da deteção porque a amplificação inicial do produto é usada como o alvo de uma segunda amplificação. Contudo, esta técnica requer muito cuidado no manuseamento para prevenir resultados falsos-positivos que podem ocorrer por contaminação.

#### RT-PCR

Esta técnica consiste numa amplificação de parte da informação genética deste vírus partindo da transição da cadeia simples de RNA para uma cadeia de cDNA (cadeia de DNA complementar), seguida da realização de uma técnica PCR. É uma técnica bastante sensível e específica mas não é das mais acessíveis devido ao seu custo na obtenção dos materiais necessários e ao seu procedimento complexo, o que exige a presença de pessoal especializado e laboratórios devidamente equipados. Tais condições nem sempre são possíveis de serem cumpridas em países hiperendémicos, face ao seu estatuto financeiro.

#### Deteção da proteína NS1

Um método simplificado de diagnóstico durante a fase aguda da doença, que se compara ao isolamento viral ou à deteção de ácido nucleico, é a deteção de antígenos virais na corrente sanguínea. Contudo a deteção de antígenos na fase aguda da doença numa infeção secundária pode ser comprometida pela pré-existência de imunocomplexos de IgG viral. Novos desenvolvimentos em técnicas baseadas em reacções imuno-enzimáticas do tipo “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) e

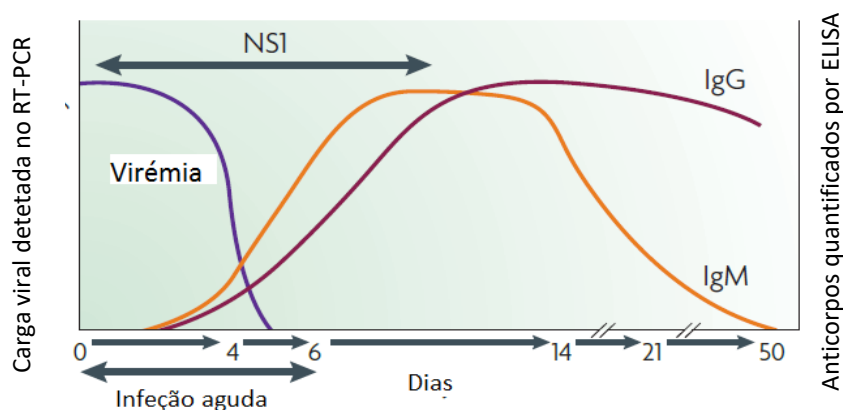
testes imunocromatográficos, que detetam a proteína não-estrutural 1 (NS1), têm demonstrado que altas concentrações deste antígeno podem ser detetadas em infeções primárias e secundárias até nove dias após a infeção (Dussart *et al.*, 2006).

Recorrendo ao método de ELISA comum de deteção de antígeno NS1, em que os poços da placa se encontram revestidos com anticorpos para NS1, se a amostra a ser testada estiver infetada por dengue, haverá degradação de um substrato pela ação de um enzima (geralmente uma peroxidase) que se encontra conjugado ao anticorpo específico para o antígeno da NS1, logo será possível observar-se uma reação crómica. Um ELISA de deteção de antígeno NS1 à base de anticorpos serotipo-específicos foi desenvolvido recentemente e demonstrou boa especificidade serotípica (Ding *et al.*, 2011).

#### **1.4.2. Métodos indiretos**

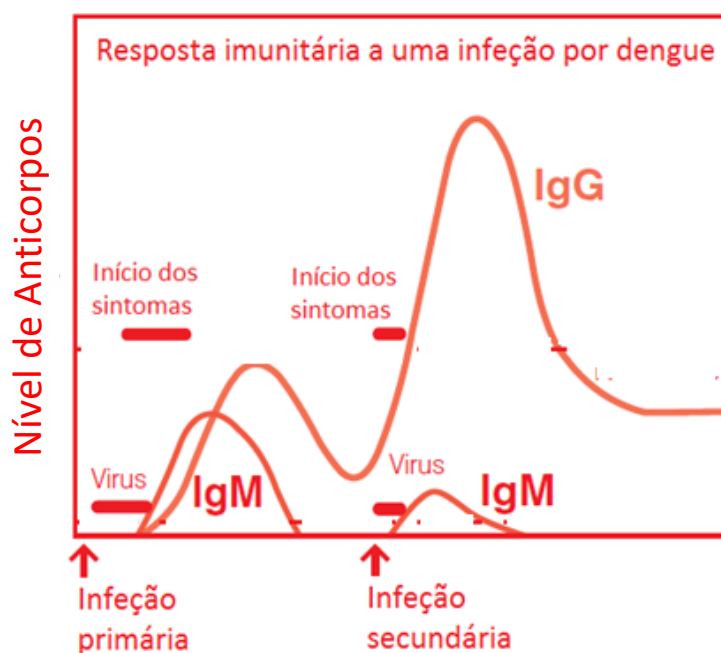
Os métodos indiretos para diagnóstico de dengue regem-se pela procura de anticorpos no soro do indivíduo suspeito de infeção por dengue.

A resposta imune adquirida ao vírus da dengue consiste na produção de imunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) que são, principalmente, específicos para a proteína do invólucro do vírus. A intensidade da resposta varia dependendo se o indivíduo tem uma infeção primária ou uma infeção secundária. Durante uma infeção primária por dengue (figura 11), observa-se que as concentrações de anticorpos IgG e IgM aumentam de forma regular, começando no segundo dia de infeção. A concentração de IgM estabiliza entre os dias sete e 14, e depois vai diminuindo, entre os dias 14 e 50, para níveis indetetáveis. A concentração de IgG atinge o seu pico por volta do dia 12 e começa gradualmente a diminuir entre os dias 13 e 50. Os níveis de IgG ainda estão relativamente elevados 50 dias após a infeção (Guzman *et al.*, 2010). Na figura 11 é possível também observar a variação dos principais marcadores de diagnóstico para uma infeção por dengue: o vírus, enquanto este ainda se encontra em circulação no sangue, produção do antígeno NS1 e a produção de anticorpos IgM e IgG.



**Figura 11** - Resposta imunitária numa infeção primária por dengue (adaptado de Guzman *et al.*, 2010).

A resposta de IgM em infeções primárias apresenta, geralmente, títulos mais elevados e mais específicos do que acontece em infeções secundárias, ao passo que a resposta por IgG apresenta títulos consideravelmente superiores durante uma infeção secundária do que numa infeção primária (figura 12). Este tipo de resposta acontece independentemente da infeção secundária ser provocada pelo mesmo serotipo ou por um serotipo diferente. No entanto, uma infeção secundária por um serotipo diferente tem a agravante da possível reação ADE, anteriormente referida.



**Figura 12** - Os títulos de IgM e IgG variam consoante se a infeção é primária ou secundária (adaptado a partir de documentação PanBio 2014).

É difícil utilizar a serologia como forma de identificação do serotipo de dengue após uma infecção, porque os anticorpos produzidos depois de uma infecção primária muitas vezes demonstram algum nível de reatividade cruzada com os outros serotipos de dengue. Anticorpos formados imediatamente a seguir a uma infecção secundária têm uma forte reatividade cruzada dentro do grupo da dengue e também, até certo nível, com outros flavivírus (Innis *et al.*, 1989).

Os métodos indiretos utilizados no diagnóstico da dengue são menos específicos e sensíveis que os diretos, uma vez que pode haver reação cruzada com outros flavivírus podendo dar origem a falsos positivos. De entre os testes indiretos mais utilizados neste diagnóstico encontramos a reação de inibição de hemaglutinação e os testes ELISA. No primeiro detetam-se anticorpos específicos que, quando presentes, reconhecerão antígenos na superfície de eritrócitos, causando aglutinação. Os segundos consistem na procura de imunoglobulinas no soro para o antígeno de interesse. Se estas estiverem presentes, uma cor vai-se desenvolver provocada pela degradação de um substrato adicionado ao ensaio. Este substrato será degradado pela ação de um enzima (geralmente uma peroxidase) que se encontra conjugado ao anticorpo específico para as imunoglobulinas em causa. O teste padrão no que se refere aos métodos indiretos de diagnóstico da dengue é o PRNT (“Plaque reduction neutralization test”).

#### *PRNT (Plaque reduction neutralization test)*

Neste teste a capacidade do anticorpo se ligar ao vírus é medida através da redução do número de placas formadas em monocamadas de células já previamente infetadas por vírus da dengue. Este teste é comumente realizado em placas de seis poços em que geralmente se utilizam monocamadas de células Vero ou células LLC-MK2, uma vez que estas são mais recetivas a infeções virais. É um teste relativamente lento, necessita de 3-4 dias para se obter a formação de placas e respetiva análise e é difícil, a nível logístico, de ser realizado em larga escala. O poder quantitativo do PRNT depende do número de poços examinados e o número de placas contadas visualmente pelo investigador. Uma vez que o teste envolve a utilização de vírus vivo e infeccioso, este tem que ser realizado por investigadores experientes numa instalação de isolamento biológico apropriada (Pierson *et al.*, 2006). Este teste deteta a presença de anticorpos neutralizantes (anticorpos que

defendem a célula de um antígeno ou corpo infetante, neutralizando qualquer efeito que este tenha biologicamente) conseguindo-se determinar qual o serotipo de dengue causal da infeção. É considerado o teste padrão por se ter mostrado mais sensível e específico que os restantes testes indiretos (Lukman *et al.*, 2016)

#### Metodos aplicados à deteção de IgM

Anticorpos IgM são inicialmente detetáveis entre os três a cinco dias de infeção após o início da febre em cerca de ~50% dos pacientes hospitalizados e quase todos os testes, quando os ensaios são realizados cinco ou mais dias após o início da febre têm uma sensibilidade e especificidade de ~90% e 98% respetivamente. Os resultados destes últimos podem ser fortemente influenciados pela qualidade do antígeno utilizado e podem variar bastante entre “kits” comerciais. Muitos “kits” de ELISA utilizam antígenos da proteína E do vírus da dengue de todos os quatro serotipos, permitindo assim que o teste consiga identificar qualquer infeção por dengue, independentemente do serotipo infetante. Mas, como as IgM circulam no sangue até mais que três meses após infeção, a sua presença pode não ser indicativa de uma infeção decorrente. Para se concluir que se trata duma infeção atual, precisa-se de uma demonstração de seroconversão (em que se verifique alterações significativas no título de anticorpos) (Peeling *et al.*, 2010).

O teste MAC-ELISA é um destes testes que deteta IgM e costuma ser um teste não-quantitativo, de diluição única em que os resultados positivos tendem a ser reportados como “uma infeção recente por flavivírus”.

Os testes rápidos diagnósticos para IgM foram desenvolvidos como um método rápido e fácil para utilização no campo. A maioria destes testes utilizam antígenos recombinantes para todos os quatro serotipos existentes e os resultados são obtidos entre 15 a 90 minutos. Quatro destes “kits” foram avaliados e a sua sensibilidade variou entre os 21%-99% e a sua especificidade de 77%-98% em comparação com os testes ELISA. Falsos positivos foram associados a pacientes com malária ou com infeções antigas por dengue (TDR/WHO, 2009 e Hunsperger *et al.*, 2009). O formato ELISA demonstra uma maior sensibilidade a detetar anticorpos específicos para dengue que os testes rápidos, mas os testes rápidos são mais práticos para utilização no campo, com resultados disponíveis num curto espaço de tempo.

### Métodos aplicados à detecção de IgG

Os testes para detecção de IgGs podem ser utilizados para diferenciar infecções passadas de infecções correntes, se se comparar os resultados obtidos a partir de soro retirado em momentos diferentes dum mesmo paciente. Esses testes são geralmente feitos recorrendo a múltiplas diluições de cada soro testado para determinar um valor de referência quanto ao título de anticorpos.

Os testes de avidéz de IgGs podem ser usados para determinar se uma infecção é primária ou secundária, baseado no princípio que a avidéz dos IgGs é baixa para uma primeira exposição aos antígenos mas aumenta ao longo das semanas e dos meses após a infecção. Para a diferenciação entre uma infecção primária e uma infecção secundária estes testes são considerados mais sensíveis que os testes de inibição de hemaglutinação (HAI).

Os testes ELISA para detecção IgGs, embora apresentem maior sensibilidade, exibem o mesmo tipo de reatividade cruzada com outros flavivírus tal como os testes HAI, não podendo, assim, ser usados para identificar os diferentes serotipos de vírus da dengue (Peeling *et al.*, 2010).

Nos “kits” ELISA para detecção de imunoglobulinas, as placas vêm revestidas com uma camada de antígenos de forma a que as eventuais IgMs ou IgGs (ou ambos em simultâneo) presentes no soro do indivíduo se liguem a estes antígenos. A presença destes imonocomplexos é então detetada por um anticorpo conjugado com uma enzima que na presença do respetivo substrato origina uma reação colorimétrica.

O trabalho que aqui apresentamos focar-se-á na aplicação de métodos indiretos para detecção de IgG anti-dengue na população residente da Ilha da Madeira onde só se registou um único surto da doença em 2012-2013. Assim, recorreu-se ao “kit” de ELISA indireto da PanBio® para a detecção de IgGs, de modo a estimar o número total de pessoas infetadas pelo vírus da dengue durante o surto e a identificar qual o género e as faixas etárias mais afetados. Durante este estudo avaliou-se também a eficácia de um novo método de ELISA “in-house” criado pelo “Institut Pasteur”, usando como referência os resultados obtidos pelo “kit” da PanBio® ELISA indireto para detecção de IgGs. Este novo teste utiliza saliva como material biológico para a detecção de



anticorpos anti-dengue, de forma a se perspetivar um novo método diagnóstico menos invasivo e com resultados de mais fácil e rápida obtenção.

## 2. Objetivos

A dengue é uma patologia febril que se tem vindo a expandir a nível mundial e é atualmente das doenças transmitida por vetores que mais morbilidade causa nas populações humanas registando *ca* de 50 a 100 milhões de casos anuais.

Este arbovírus é transmitido por mosquitos do género *Aedes*, principalmente pela espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

Em 2005, *Ae. aegypti* foi pela primeira vez registado na Ilha da Madeira, no Concelho do Funchal, depois de este ter sido erradicado de território continental em 1956 (Holstein, 1967 e Ribeiro *et al.*, 1988). Desde então, a espécie tem vindo a expandir-se em toda a costa sul da ilha (Gonçalves *et al.*, 2008). Atualmente, estudos genéticos sugerem que a espécie *Ae. aegypti* presente na ilha poderá ter origem na América Latina, nomeadamente no Brasil ou na Venezuela. Esta ideia é suportada pela análise genética de DNA mitocondrial (mtDNA) e polimorfismos genéticos associados à resistência “knockdown” (kdr) (Seixas *et al.*, 2013).

Apesar da existência de programas de controlo do vetorial, em Outubro de 2012, um surto de dengue, provocado pelo serotipo 1 do vírus (DENV-1), ocorreu na Ilha da Madeira, tendo-se registado 2168 de casos prováveis, 1080 dos quais confirmados laboratorialmente. No entanto, crê-se que este número esteja subestimado uma vez que 80% dos casos de dengue são assintomáticos (Bhatt *et al.*, 2013).

Os métodos de deteção da presença de uma infeção, passada ou presente, por vírus da dengue em hospedeiros humanos são vários e com diferentes abordagens. Estes variam desde métodos diretos como RT-PCR à deteção do vírus em cultura de células e de deteção de antígenos, até aos métodos indiretos de deteção de anticorpos IgM e IgG. É de interesse melhorar cada vez mais os métodos de diagnóstico da infeção e de deteção do vírus. Testes mais específicos e sensíveis permitirão melhorar os conhecimentos atuais sobre a dinâmica da resposta imunitária nos humanos, principalmente na presença de infeções sequenciais por serotipos diferentes, e aperfeiçoar os sistemas de vigilância epidemiológica. Desta forma, este estudo pretende realizar um estudo epidemiológico na Ilha da Madeira com o intuito de: (i) compreender a real dimensão do número de pessoas afetadas pelo surto de 2012-2013, utilizando o protocolo de ELISA indireto para IgG da PanBio®, (ii) determinar a viabilidade da

saliva para a deteção de imunoglobulinas G (IgG) anti-dengue com o “kit” Panbio®; (iii) testar com as amostras recolhidas, um novo método de diagnóstico do tipo ELISA que foi desenvolvido pelo “Institut Pasteur” (designado de ELISA “in-house”) para a deteção de anticorpos IgG específicos para DENV, quer soro quer na saliva de pacientes.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Amostragem

Para a realização do estudo epidemiológico, planeou-se efetuar uma amostra estratificada por género e faixas etárias decenais. Esta estimativa amostral foi conseguida com base nas Estimativas da População Residente em 2014 da população da Região Autónoma da Madeira, segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE, 2014). Para o cálculo do tamanho amostral partiu-se do princípio de que, no surto de 2012, a infeção do vírus da dengue apresentou uma distribuição de 20% sintomáticos e 80% de casos assintomáticos, tal como referido em Bhatt *et al.*, 2013. Desta forma, de 258 686 pessoas (população da Madeira), e sabendo que houve 1080 casos confirmados laboratorialmente durante o surto de 2012, calculou-se uma amostra estratificada por género e faixa etária em relação à população total da Região Autónoma da Madeira (com um intervalo de confiança -IC- de 95%). Partindo do pressuposto acima mencionado que apenas 20% dos casos tenham sido diagnosticados laboratorialmente, estima-se, assim que *ca* de 5400 pessoas tenham contraído infeção por vírus da dengue durante o surto de 2012. Sabendo a população residente na Região Autónoma da Madeira no momento do estudo e sabendo a estimativa do número de pessoas que tiveram dengue, obtém-se uma estimativa da possível prevalência do vírus, de 2,1%. Aplicando a fórmula de cálculo para se saber a dimensão da amostra, sabendo a o tamanho da população total:

$$n = \frac{z_{\alpha/2}^2 NP(1-P)}{\varepsilon^2 (N-1) + z_{\alpha/2}^2 P(1-P)}$$

$\varepsilon$  = Margem de erro

$P$  = prevalência do vírus - estimativa de pessoas que tiveram dengue/ pop. Madeira\*100

em que  $\varepsilon=0,02$ ,  $P= 0,021$ ;  $z_{\alpha/2} = 1,96$  e  $N$  é o tamanho da população, então a amostra necessária consiste em 197 participantes, com mais 20% suplentes obtém-se uma amostra final de 237 participantes.

Na tabela 1 é possível verificar a distribuição por género e faixa etária decenal da amostra esperada para que esta seja o mais representativa possível da população da Madeira. Esta distribuição está determinada a partir dos dez anos de idade uma vez que conseguir uma população representativa para a faixa etária dos 3-9 anos apresentava

grandes dificuldades visto que, duma maneira geral, esta faixa etária não se dirige a laboratórios para realizar análises sanguíneas regulares.

**Tabela 1-** Distribuição da amostra populacional esperada por género e por faixa etária.

<b>Grupo etário</b>	<b>H*</b>	<b>M**</b>	<b>HM***</b>
<b>10 – 19 anos</b>	17	15	32
<b>20 – 29 anos</b>	17	17	34
<b>30 – 39 anos</b>	19	20	39
<b>40 – 49 anos</b>	20	22	42
<b>50 – 59 anos</b>	17	20	37
<b>60+ anos</b>	21	33	54
<b>Total</b>	111	126	237

Legenda: \* Homens; \*\*Mulheres; \*\*\* Homens e mulheres

### **3.2. Colheita das amostras biológicas**

A recolha das amostras biológicas foi feita no Madeira Medical Centre e no laboratório Henriques de Gouveia (laboratórios privados mas ambos ligados ao Serviço Nacional de Saúde), no Funchal, dado que a Ilha da Madeira possui os serviços de saúde muito centralizados no Funchal.

Dos participantes, recolheu-se uma amostra de sangue e outra de saliva para tubos de BD Vacutainer® SST® II Advance 8.5ml, específico para recolha de soro, e tubos de Falcon, respetivamente. Todos os participantes deste estudo apresentaram-se nos referidos laboratórios com o propósito de fazerem análises sanguíneas regulares. Previamente à recolha de sangue, estes utentes foram informados sobre o estudo em causa. Após todos os procedimentos do estudo terem sido esclarecidos, foi perguntado a cada utente se queria participar no estudo e cada participante assinou o consentimento informado respetivo (Anexo I) e preencheu um inquérito referente a dados pessoais e de saúde relevantes (Anexo II). Estes dados englobam mais precisamente informação acerca da idade, género, peso, concelho de origem, se viajou para países endémicos de dengue, se tinham sido imunizados contra o vírus da febre-amarela e se tinham suspeita e/ou confirmação de uma infeção por dengue. Estes fatores são determinantes para uma

boa interpretação dos resultados obtidos, uma vez que a fisionomia e longevidade do participante, o eventual risco de já ter contraído uma infecção por vírus dengue e o facto de possuírem a vacina da febre-amarela (inoculação que pode provocar reacção cruzada com os testes utilizados) podem influenciar os resultados deste estudo e/ou as conclusões deste inquérito epidemiológico.

No próprio dia da recolha, as amostras de sangue foram centrifugadas e fez-se uma alíquota de 300µL de soro de cada amostra que foi recolhida para tubos de Eppendorf de 1,5mL. Procedeu-se então à congelação das amostras a -20°C para posterior envio para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical. O transporte das amostras realizou-se utilizando gelo seco para conservação das mesmas.

No Instituto de Higiene e Medicina Tropical realizou-se o teste ELISA indireto para IgG da PanBio®. Selecionou-se este teste uma vez que os testes de ELISA são de fácil execução e garantem bons resultados a nível de sensibilidade e especificidade, sendo, em regra, os segundos em linha de escolha a seguir ao PRNT. Este teste baseia-se numa placa de 96 poços em que cada poço já está revestido com antígenos do vírus da dengue. Dos 96 poços, dois são utilizados para aplicação dos controlos (positivo e negativo), três para os calibradores (usados para se calcular o valor de “index-value” que determina se uma amostra é positiva ou negativa) e os restantes para as amostras de interesse. Os controlos e os calibradores do teste são diluídos (1:100) antes da sua introdução nos poços, assim como as amostras. De seguida a placa é incubada com um anticorpo conjugado com peroxidase. Finalmente adiciona-se um substrato enzimático. Nos alvéolos da placa com amostras positivas este substrato irá ser degradado pela ação da peroxidase dando origem a um produto de cor amarela. Nos alvéolos em que foram aplicadas amostras negativas tal reacção corada não ocorrerá. As amostras de saliva de participantes com resultados seropositivos foram posteriormente testadas com o mesmo teste.

Uma vez que houve resultados do teste ELISA indireto para IgG com reacções exacerbadas, recorreu-se também ao teste ELISA Capture para IgG da PanBio® dado que este teste permite identificar eventuais infeções secundárias. Este “kit”, de acordo com o fabricante, apresenta uma taxa de sensibilidade e especificidade de 96,3% e 100% respetivamente. Para suportar a viabilidade do teste, Vazquez *et al.*, (2007) realizaram um estudo para avaliar a eficácia deste “kit”, onde obtiveram 96,8% de

sensibilidade para infecções secundárias. O protocolo deste último assemelha-se ao anteriormente descrito mas os poços vêm por sua vez revestidos com um anticorpo IgG anti-humana que se ligará à amostra e só posteriormente se adiciona o antígeno já ligado ao anticorpo conjugado com peroxidase sensível ao substrato. Neste teste, apenas amostras com um título elevado de anticorpos (infecções secundárias) é que irão obter um resultado positivo. Desta forma no teste ELISA Capture para IgG testaram-se as amostras com resultados positivos no ELISA indireto para IgG e 10% das amostras com resultado negativo no ELISA indireto para IgG, portanto 36 amostras de participantes seronegativos.

### **3.3. Protocolo ELISA “in-house”**

O teste de ELISA “in-house” é um ensaio ELISA indireto, desenvolvido pelo “Institut Pasteur” para a detecção de anticorpos IgG contra vírus da dengue presentes na saliva e no soro de pacientes. Para este teste ser validado como teste diagnóstico, processaram-se alíquotas de soro e saliva dos participantes considerados seropositivos no ELISA indireto PanBio® e selecionou-se aleatoriamente 10% do total das amostras com resultado negativo. O protocolo pormenorizado deste teste “in-house” poderá ser consultado no Anexo III. A eficácia do teste foi aferida calculando a sensibilidade e especificidade do mesmo com base nos resultados obtidos no teste ELISA indireto que para este caso específico funcionou como técnica “gold-standard”.

### **3.4. Tratamento estatístico**

Recorreu-se ao programa estatístico GraphPad Prism 6.01, para a realização de testes de contingência Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) com o teste exato de Fisher, para analisar tabelas de contingência 2x2 e testar a hipótese nula: variável da linha e a variável da coluna são independentes. Utilizou-se este teste para se perceber a relação entre a presença de IgG anti-dengue no soro dos participantes e o seu género, o facto de terem viajado ou não para países endémicos e o fator de terem sido, ou não, vacinados contra a febre-amarela. Para avaliar se os participantes seropositivos pertenciam a uma faixa etária e concelho de residência específicos utilizou-se o teste “Two-way ANOVA – Sidak’s multiple comparisons” que tem como finalidade perceber se a variância entre colunas (positivos/negativos) e linhas (variação de positivos/negativos por faixa etária

ou por conchelo) é estatisticamente diferente. A relação entre a seropositividade dos participantes e as variáveis faixa etária e peso foi também avaliada por testes de regressão linear.

Utilizaram-se também os testes de contingência Chi-quadrado ( $\chi^2$ ), nomeadamente o teste exato de Fisher, para comparar os resultados do teste ELISA “in-house” com os previamente obtidos no teste de ELISA indireto para IgG da PanBio®.

Os resultados foram analisados utilizando um intervalo de confiança (IC) de 95% para todos os testes estatísticos realizados.

### **3.5. Aspectos éticos**

A todos os participantes, que acederam colaborar no estudo após terem tomado conhecimento de todos os procedimentos a efetuar, foi solicitada a assinatura do consentimento informado. No caso de menores, foi requerida a assinatura de um dos progenitores ou guardião legal. A todos os participantes foi solicitado o preenchimento dum inquérito referente a dados pessoais e de saúde relevantes. Este inquérito foi construído de modo a conter duas partes, uma branca e outra cinza, sendo que a parte branca será destruída ficando só a parte cinza, que contém apenas o número de identificação da amostra anonimizando assim todos os dados. Foi apenas a informação constante na parte cinza que ficou guardada na base de dados (ver Anexo I e II).

Qualquer participante que desejasse mais esclarecimentos posteriores à colheita, ou caso decidisse anular a sua participação, podia entrar em contacto com o laboratório onde foi realizada a colheita, cuja informação seria remetida para o IASaude, IP-RAM, que a transmitiria para o IHMT, acerca de qualquer necessidade requerida pelo participante. Eventuais explicações complementares só poderão ser efetivadas antes da anonimização da amostra. A aprovação de ética por parte do IHMT tem o número nº1-2016.



## **4. Apresentação e análise de resultados**

### **4.1. Estudo da seroprevalência**

Dos 355 indivíduos que aceitaram participar no estudo, 153 (43,1%) foram incluídos no estudo quando se dirigiram ao Laboratório Henriques de Gouveia e 202 (56,9%) ao Madeira Medical Centre. Da amostra total, 134 são do sexo masculino (37,7%) e 221 são do sexo feminino (62,3%); 19 (5%) encontram-se na faixa etária 10-19 anos, 38 (11%) na faixa dos 20-29 anos, 61 (17%) dos 30-39 anos, 60 (17%) dos 40-49 anos, 71 (20%) dos 50-59 anos e 106 (30%) na faixa etária dos 60+ anos.

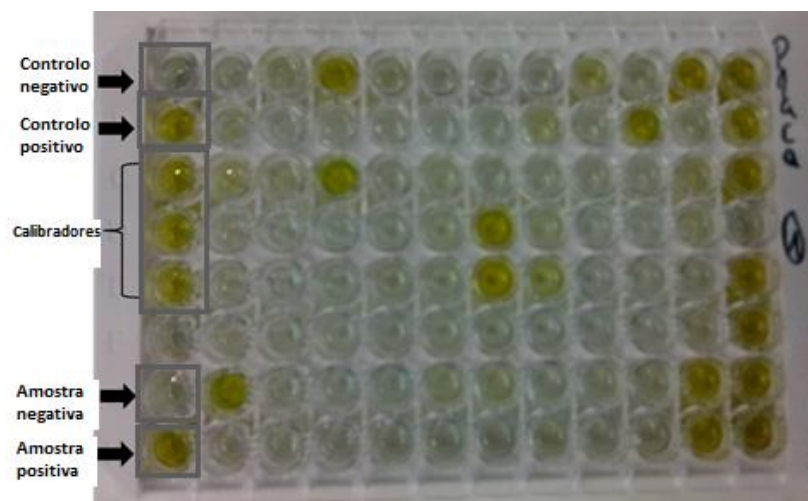
Na tabela 2 pode-se observar a distribuição dos participantes pelas faixas etárias decenais de acordo com o género.

**Tabela 2** - Distribuição da amostra populacional obtida por género e por faixa etária.

<b>Grupo etário</b>	<b>H*</b>	<b>M**</b>	<b>HM***</b>
<b>10 – 19 anos</b>	7	12	19
<b>20 – 29 anos</b>	17	21	38
<b>30 – 39 anos</b>	17	44	61
<b>40 – 49 anos</b>	23	37	60
<b>50 – 59 anos</b>	29	42	71
<b>60+ anos</b>	41	65	106
<b>Total</b>	134	221	355

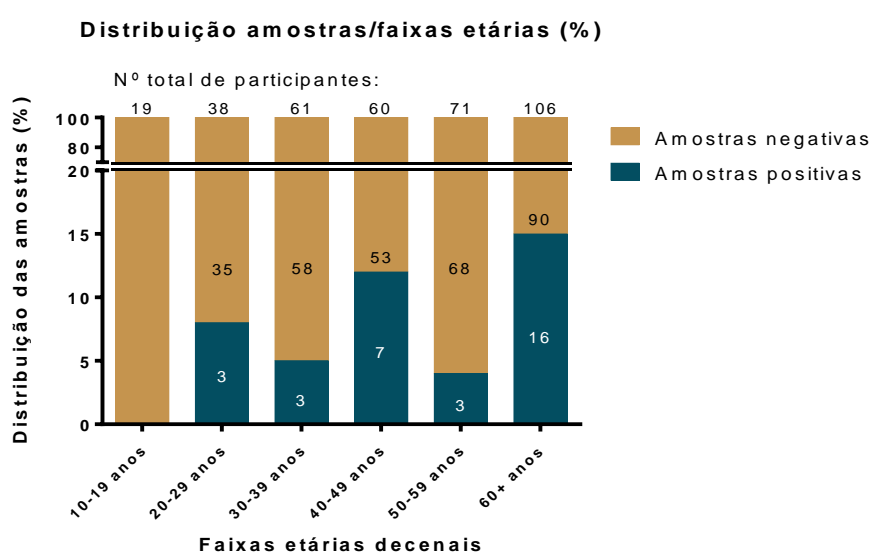
Legenda: \* Homens; \*\*Mulheres; \*\*\* Homens e mulheres

Após a realização do teste ELISA indireto para IgG da PanBio® para todas as amostras, 32 (9% da amostra total) obtiveram resultado positivo (na figura 13 é possível observar a organização duma das placas realizadas com o teste ELISA indireto para IgG).

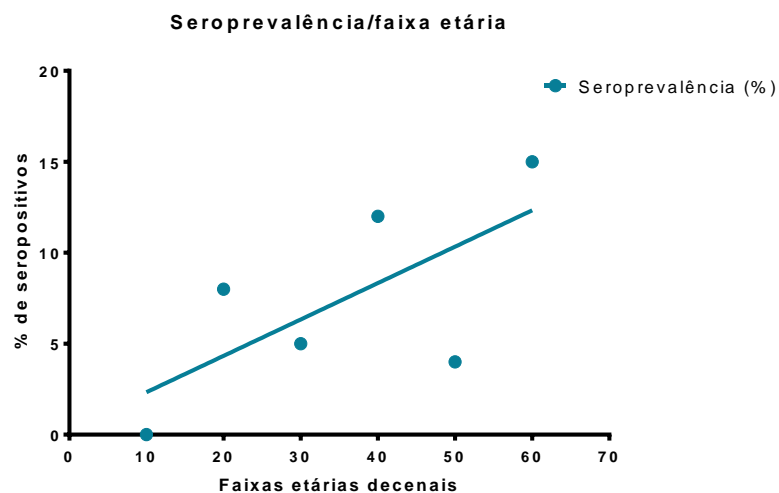


**Figura 13** - Representação da organização da placa no final do protocolo do teste de ELISA indireto para IgG (fotografia da autora).

A distribuição das amostras no ELISA indireto para IgG de acordo com a faixa etária do participante pode ser observada no gráfico 1 variando as amostras positivas de 0% na faixa etária dos 10-19 anos até 15% na faixa etária 60+ anos. De acordo com o teste Two-way ANOVA – Sidak’s multiple comparisons” não foram encontradas diferenças significativas a nível estatístico entre as faixas etárias estabelecidas ( $p=0,22$ ) no que se refere à seropositividade dos participantes. O mesmo resultado foi obtido na análise de regressão ( $R=0,46$ ) tal como ilustrado no gráfico 2, onde é possível observar a representação da regressão linear entre as duas variáveis.



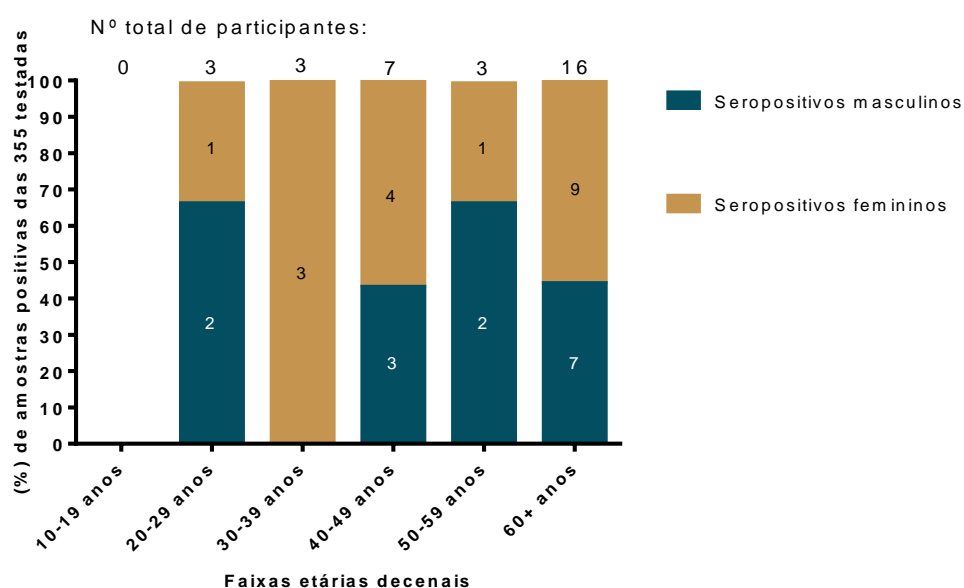
**Gráfico 1** - Distribuição das amostras testadas no ELISA indireto da Panbio® pelas faixas etárias.



**Gráfico 2** - Regressão linear entre as amostras positivas e a distribuição das mesmas por faixa etária.

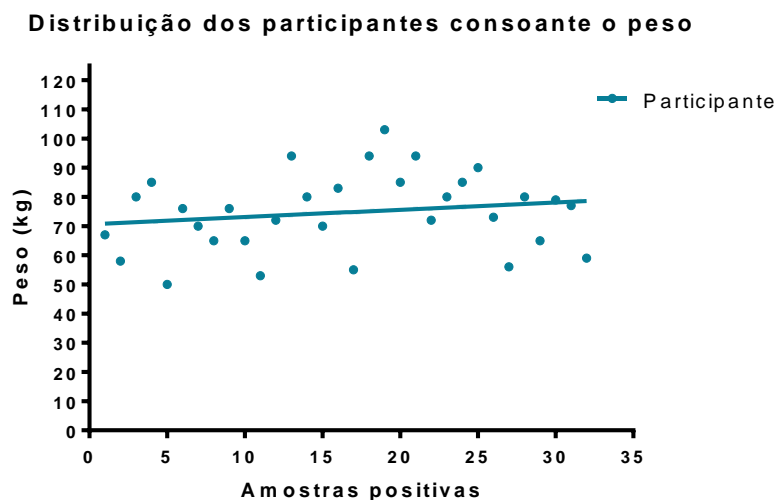
Das 32 amostras, 14 foram obtidas de elementos do sexo masculino (4% da amostra total) e 18 elementos do sexo feminino (5% da amostra total) obtendo-se um rácio de homem/mulher de 0,77 (gráfico 3). No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre géneros no que se refere ao número de amostras IgG positivas ( $p=0,45$ ).

**Nº seropositivos masculinos e femininos consoante a faixa etária (%)**



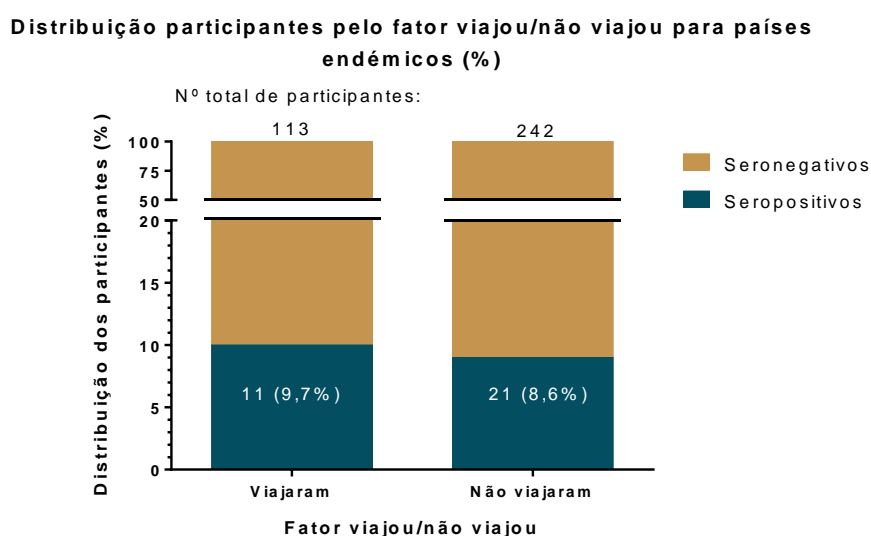
**Gráfico 3** - Representação gráfica da distribuição dos participantes pelas faixas etárias e género.

Como se pode observar no gráfico 4, o peso dos participantes não obteve diferenças estatisticamente significativas ( $R=0,03$ ). Note-se que todas as amostras positivas são referentes a participantes >20 anos.



**Gráfico 4** - Distribuição dos participantes seropositivos consoante o peso.

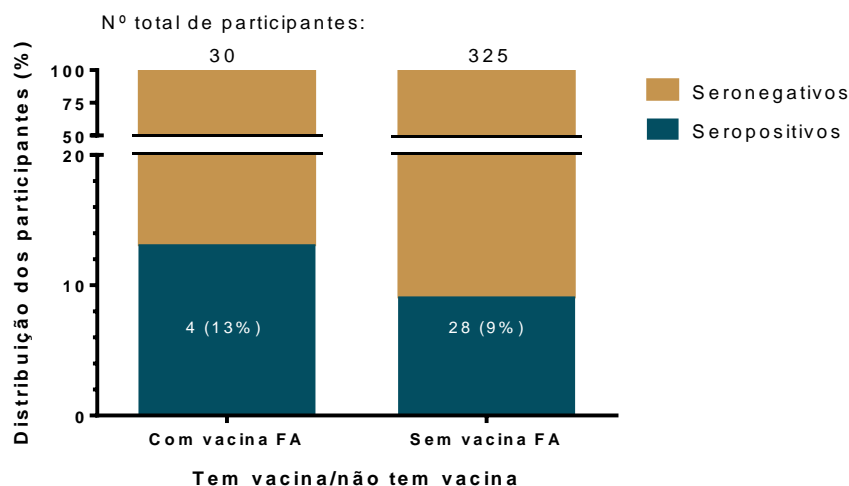
Constata-se que a prevalência de casos positivos é maior naqueles que viajaram para países endémicos (11 amostras positivas em 113) comparativamente aos que não saíram da ilha (21 amostras positivas em 242) (gráfico 5). Em relação ao fator viajou/não viajou para países endémicos, as diferenças nos dados não foram estatisticamente significativas ( $p=0,84$ ).



**Gráfico 5** - Representação gráfica da distribuição da proporção de participantes seropositivos e seronegativos pelo fator “viajou/não viajou para países endémicos”.

No gráfico 6 observa-se a distribuição das amostras consoante o fator “tem vacina da febre-amarela/não tem vacina da febre-amarela” em que quatro das amostras positivas os participantes possuem vacina da febre-amarela e as 28 restantes são de participantes que não possuem ( $p=0,33$ ).

**Distribuição dos participantes pelo factor tem/não tem vacina da febre amarela (%)**



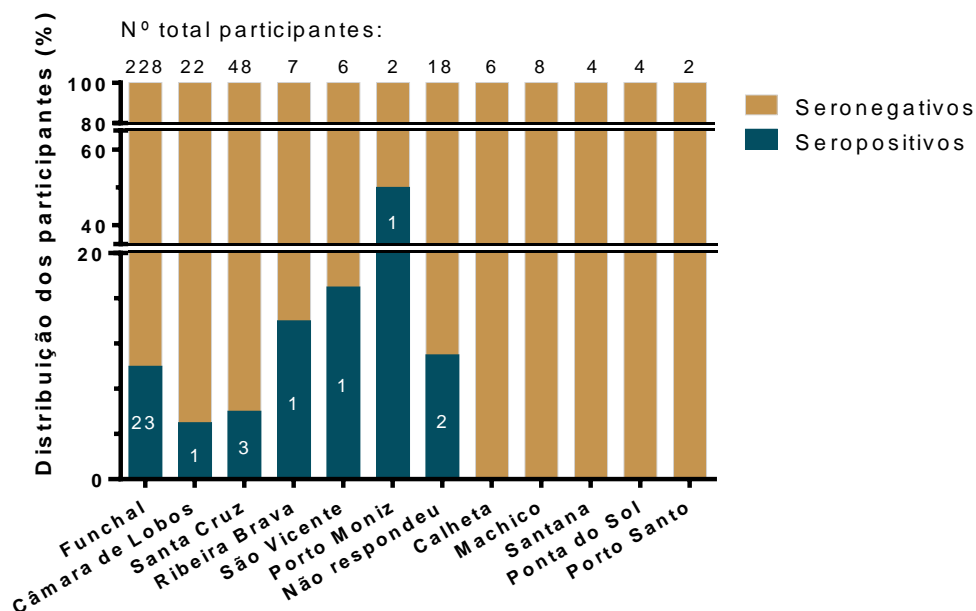
**Gráfico 6** - Representação gráfica da distribuição das amostras consoante o fator “tem vacina da febre-amarela/não tem vacina da febre-amarela”.

No gráfico 7 e figura 14, está representada a distribuição geográfica dos participantes seropositivos em que se evidencia que a zona sul da Ilha da Madeira foi a zona mais afetada, sendo a cidade do Funchal a região que apresentou maior número de participantes seropositivos (23 de 32). Neste estudo obtiveram-se participantes de todos os 11 concelhos do arquipélago da Madeira, muito embora não sendo representativos da população para cada concelho (Tabela 3).

**Tabela 3** - Distribuição do número total das amostras e das amostras com resultado positivo por concelho de residência.

Concelho	Nº de amostras testadas	Nº de amostras positivas
Funchal	228	23
Câmara de Lobos	22	1
Santa Cruz	48	3
Ribeira Brava	7	1
São Vicente	6	1
Porto Moniz	2	1
Calheta	6	0
Machico	8	0
Santana	4	0
Ponta do Sol	4	0
Porto Santo	2	0
Não respondeu	18	2

**Distribuição de amostras positivas/concelho de residência**



**Gráfico 7-** Representação gráfica da distribuição dos participantes pelos concelhos de residência.



**Figura 14** - Mapa com a distribuição geográfica do local de residência dos participantes seropositivos pela Ilha da Madeira.

Os dados relativos às amostras IgG positivas para cada parâmetro referido podem ser consultados na tabela 4.

**Tabela 4** - Distribuição das amostras seropositivas em relação à amostra total para todos os indicadores analisados.

	Distribuição relativa à amostra total n (%)	p - value
<b>Feminino ♀</b>	18 (5)	0,45*
<b>Masculino ♂</b>	14 (4)	
<b><u>Faixa etárias:</u></b>		0,22**
10-19 anos	0 (0)	
20-29 anos	3 (0,8)	
30-39 anos	3 (0,8)	
40-49 anos	7 (2)	
50-59 anos	3 (0,8)	
60+ anos	16 (4,5)	
<b>Viajou</b>	11 (3)	0,84*
<b>Não viajou</b>	21 (6)	
<b>Tem vacina da febre-amarela</b>	4 (1)	0,33*
<b>Não tem vacina da febre-amarela</b>	28 (8)	
<b><u>Concelho de residência:</u></b>		0,24**
<b>Funchal</b>	23 (6,5)	
<b>Câmara de Lobos</b>	1 (0,3)	
<b>Santa Cruz</b>	3 (0,8)	
<b>Ribeira Brava</b>	1 (0,3)	
<b>São Vicente</b>	1 (0,3)	
<b>Porto Moniz</b>	1 (0,3)	
<b>Não respondeu</b>	2 (0,6)	

\*teste de contingência Chi-quadrado ( $\chi^2$ ), IC de 95%.

\*\*Two-way ANOVA – Sidak's multiple comparisons, IC de 95%.



#### 4.2. Teste de ELISA indireto para IgG para saliva

As salivas dos participantes seropositivos, foram analisadas pelo mesmo teste ELISA indireto que foi utilizado para analisar a seropositividade dos participantes. De um total de 32 amostras analisadas, seis obtiveram um resultado positivo e as restantes 26 obtiveram um resultado negativo (tabela 5). Não se testaram as salivas dos participantes seronegativos e desta forma não se calculou a especificidade do teste para a saliva. No entanto, pode-se afirmar que este teste não é muito sensível para saliva uma vez que obteve uma sensibilidade de 19%.

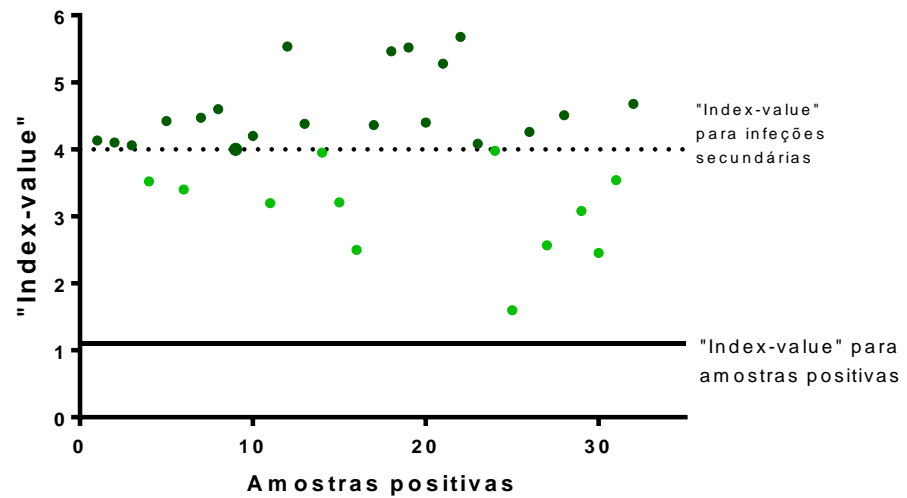
**Tabela 5** - Distribuição das amostras positivas do teste ELISA indireto relativamente às respetivas amostras de saliva.

	<b>Amostras positivas soro – IgG indireto</b>
<b>Amostras positivas saliva – IgG indireto</b>	6
<b>Amostras negativas saliva – IgG indireto</b>	26

#### 4.3. Teste ELISA “Capture” para IgG

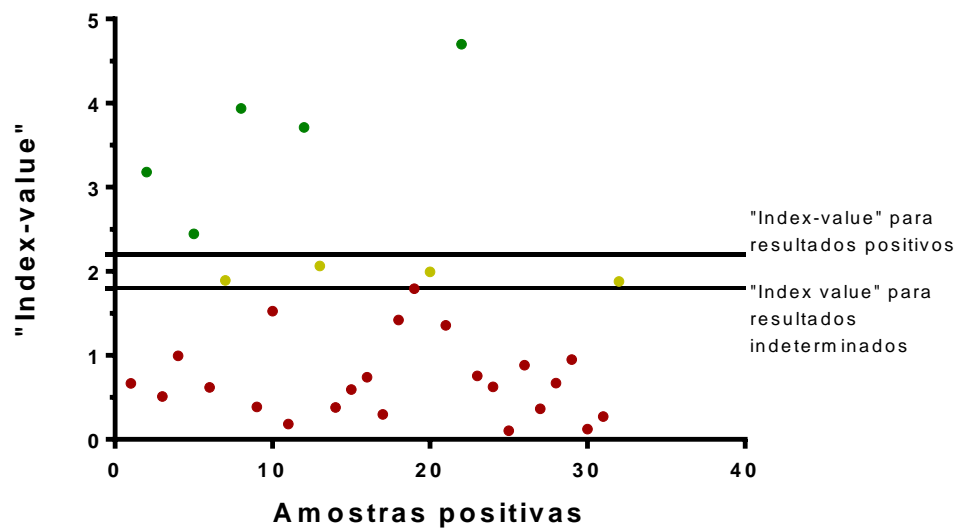
De acordo com os resultados do teste de ELISA indireto para IgG da PanBio®, das 32 amostras com resultado positivo, 20 amostras apresentaram um “index-value” superior a quatro o que, segundo a bula do “kit” utilizado, sugere a presença de infeções secundárias (gráfico 8). Desta forma, houve a necessidade de testar estas amostras com o “kit” ELISA “Capture” para IgG de forma a esclarecer a dúvida sobre quais amostras seriam efetivamente infeções secundárias. Os resultados podem ser consultados no gráfico 9 em que se constata que cinco amostras das 32 positivas no ELISA indireto, obtiveram um resultado positivo para infeção secundária e quatro obtiveram um resultado indeterminado. Como exemplo, a figura 15 é representativa da organização da placa de ELISA com os resultados finais do “kit” ELISA “Capture” para IgG da PanBio®.

### Variação do "index-value" das amostras positivas no ELISA indireto

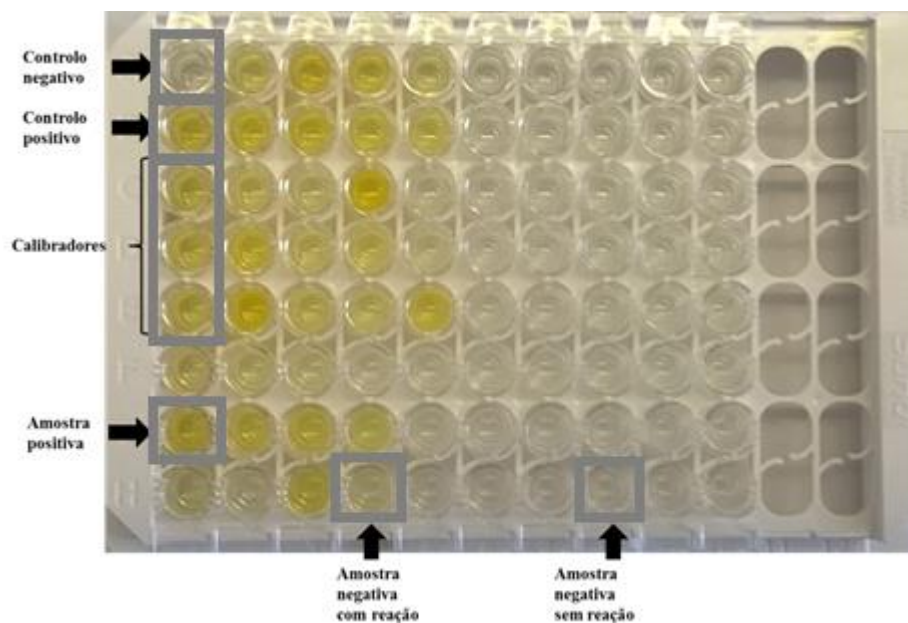


**Gráfico 8** - Representação gráfica da distribuição do “index-value” do ELISA indireto para IgG consoante as amostras positivas.

### Variação do "index-value" das amostras positivas obtidas no ELISA indireto, no teste ELISA Capture



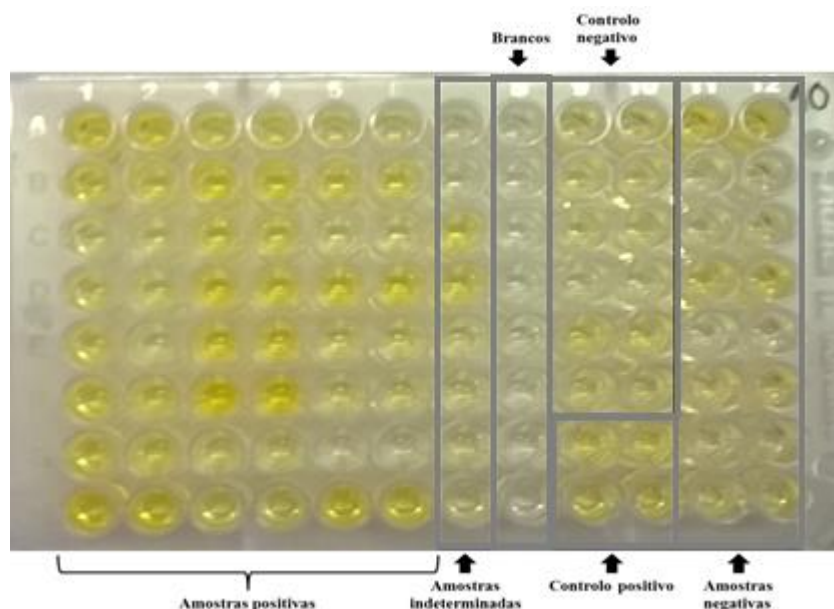
**Gráfico 9** - Representação gráfica da distribuição do “index-value” da ELISA “Capture” para IgG das amostras identificadas como positivas no ELISA indireto para IgG da PanBio®.



**Figura 15** - Representação da placa e seu aspeto final após teste IgG “Capture” (fotografia da autora).

#### 4.4. Teste ELISA “in-house”

Partindo dos resultados obtidos do ELISA indireto para IgG realizou-se então a ELISA “in-house” seguindo o protocolo descrito no Anexo III. Na figura 16 é possível observar o aspeto de uma placa no final do procedimento.



**Figura 16** - Representação da organização e aspeto geral da placa no final do procedimento do ELISA “in-house” (fotografia da autora).

Usando os valores de amostras positivas e negativas do teste ELISA indireto para IgG da PanBio® e do teste “in-house” (para ambos soro e saliva), realizaram-se as seguintes tabelas 5 e 6. É possível constatar que 23 amostras das 32 positivas testadas com o teste ELISA indireto para IgG deram também positivo no teste ELISA “in-house”, obtendo-se assim uma percentagem de 28% de amostras positivas para o ELISA indireto com resultado negativo no teste ELISA “in-house”. Relativamente às amostras negativas, 32 das 36 testadas no teste ELISA indireto, obtiveram um resultado negativo, estimando-se uma percentagem de 11% de amostras negativas para o ELISA indireto para IgG com resultado positivo no ELISA “in-house” (gráfico 10).

Relativamente à saliva testada, observa-se que seis das amostras positivas no soro no ELISA indireto obtiveram também um resultado positivo no teste ELISA “in-house”, obtendo-se uma percentagem de 81% de amostras positivas no ELISA indireto com um resultado negativo nas respetivas salivas no teste ELISA “in-house”. Nas amostras negativas, constata-se que 33 das 36 amostras negativas obtiveram um resultado também negativo nas salivas correspondentes, apresentando uma percentagem de 8% de amostras negativas no ELISA indireto com resultado positivo nas respetivas salivas no teste ELISA “in-house” (gráfico 11).

#### **4.4.1. Avaliação do teste ELISA “in-house” como método de diagnóstico serológico para a dengue**

Nas tabelas 6 e 7, é possível observar-se a distribuição dos resultados obtidos no teste ELISA Indireto para o soro e os resultados do teste ELISA “in-house” para o soro e saliva respetivamente.

**Tabela 6** - Distribuição das amostras positivas e negativas obtidas no teste ELISA indireto para IgG e as amostras de soro do teste ELISA “in-house”.

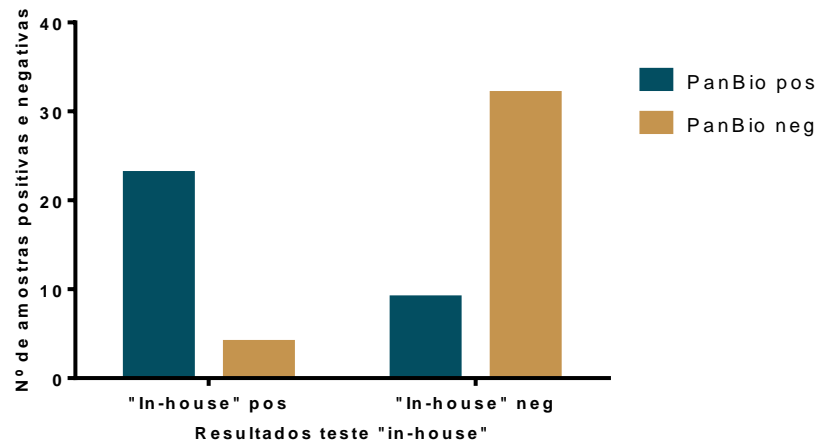
	<b>Amostras positivas – IgG Indireto (soro)</b>	<b>Amostras negativas – IgG Indireto (soro)</b>
<b>Amostras positivas – “in-house” (soro)</b>	23	4
<b>Amostras negativas – “in-house” (soro)</b>	9	32

**Tabela 7** - Distribuição das amostras positivas e negativas obtidas no teste ELISA indireto para IgG e as amostras de saliva testadas no teste ELISA “in-house”.

	<b>Amostras positivas – IgG Indireto (soro)</b>	<b>Amostras negativas – IgG Indireto (soro)</b>
<b>Amostras positivas – “in-house” (saliva)</b>	6	3
<b>Amostras negativas – “in-house” (saliva)</b>	26	33

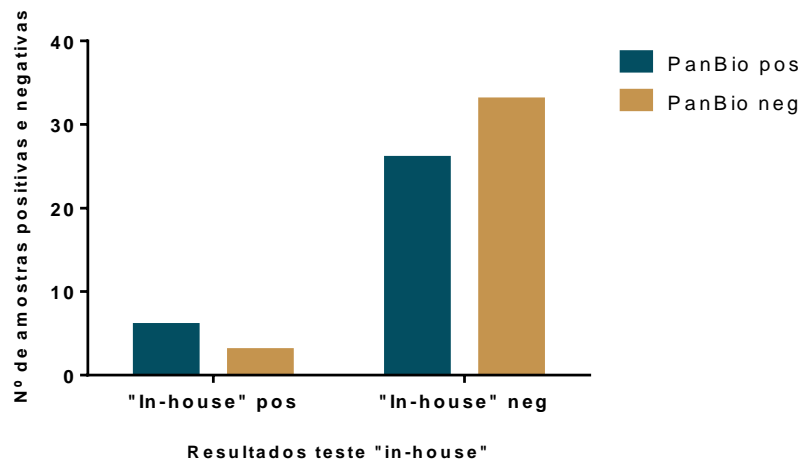
Com base nos resultados apresentados foram estimadas a sensibilidade e especificidade do teste ELISA “in-house”, produzido pelo “Institut Pasteur”, utilizando como teste padrão o teste ELISA indireto para IgG da Panbio®. Obteve-se então uma sensibilidade e especificidade do teste ELISA “in-house” para soro de 72% (IC 95%: 53%-86%) e 89% (IC 95%: 74%-97%) respectivamente e uma sensibilidade e especificidade para saliva de 19% (IC 95%: 7%-36%) e 92% (IC 95%: 78-99%) respectivamente.

**Distribuição resultados das amostras comparando  
PanBio/"in-house" para o soro**



**Gráfico 10** - Representação gráfica da distribuição dos resultados das amostras testadas comparando os resultados do soro no teste comercial indireto da PanBio® para IgG com os resultados do soro no teste ELISA “in-house”.

**Distribuição resultados das amostras comparando  
PanBio-soro/"in-house"- saliva**



**Gráfico 11** - Representação gráfica da distribuição dos resultados das amostras testadas comparando os resultados do soro no teste comercial indireto da PanBio® para IgG com os resultados da saliva no teste ELISA “in-house”.

#### **4.5. Extrapolação dos resultados do inquérito serológico para a população da Região Autónoma da Madeira**

Na tabela 8, é possível observar a distribuição dos participantes seropositivos por cada faixa etária e género assim como a extrapolação destes resultados para a população da Ilha da Madeira, obtendo-se desta forma uma estimativa do número de pessoas que anteriormente à execução deste estudo terão sido infetadas pelo vírus da dengue. Esta proporção foi calculada da seguinte forma: a partir do número de pessoas com mais de dez anos da Região Autónoma da Madeira numa determinada faixa etária multiplica-se o número de seropositivos para essa faixa etária da população da amostra, dividindo pelo número total de indivíduos que participaram no estudo da dita faixa etária; repetindo o processo para todas as faixas etárias e para os géneros.

**Tabela 8** - Estimativa do número de indivíduos potencialmente seropositivos para vírus da dengue na população da Ilha da Madeira, para cada faixa etária e para cada género.

<u>Grupo etário</u>	<u>Tamanho da amostra total n (%)</u>	<u>Distribuição de seropositivos da amostra total n</u>	<u>População da Ilha da Madeira N (%)</u>	<u>Estimativa de seropositivos para cada faixa etária da população da Ilha da Madeira N</u>
<b>10-19 anos</b>	19 (5,3)	0	31938 (13,6)	-
<b>20-29 anos</b>	38 (10,7)	3	32848 (13,9)	2593
<b>30-39 anos</b>	61 (17,2)	3	38909 (16,5)	1914
<b>40-49 anos</b>	60 (16,9)	7	41686 (17,7)	4863
<b>50-59 anos</b>	71 (20)	3	36427 (15,5)	1539
<b>60+ anos</b>	106 (29,9)	16	53425 (22,7)	8064
<b>Total</b>	355 (100)	32(9)	235 233 (100)	18974

<u>Género</u>		<u>Seropositivos da amostra total por género n (%)</u>		<u>Estimativa de seropositivos por género da população da Ilha da Madeira N</u>
<b>Feminino</b>	221 (62)	18 (5)	126 208 (54)	9532
<b>Masculino</b>	134 (38)	14 (4)	109 025 (46)	9163



## **5. Discussão**

### **5.1. Estudo da seroprevalência**

Os resultados do gráfico 1 e 2 juntamente com os testes estatísticos realizados, sugerem que não existe ligação entre a idade e uma maior probabilidade de se contrair dengue, no entanto, no decorrer do surto sugeriu-se que elementos jovens do sexo masculino dos 0 aos 19 anos e elementos do sexo feminino dos 30 aos 65 anos tiveram maior tendência para apresentar sintomas consistentes com uma infeção por dengue. Estes dados demonstram assim a importância deste estudo para se compreender a dispersão deste vírus pela população da Madeira.

Os dados obtidos acerca da idade dos participantes, são relativos a um local epidémico como a ilha da Madeira, onde apenas ocorreu um único surto. A não relação entre a faixa etária e a probabilidade de se contrair uma infeção por vírus da dengue é confirmada pelos resultados obtidos em Nîmes, no sul de França. Nesta região ocorreu um surto de dengue de 8 de Agosto a 11 de Setembro de 2015, em que se confirmaram sete casos autóctones de dengue (Succo *et al.*, 2016). A idade média destes foi de 38 anos variando dos 16 até aos 65 anos, demonstrando assim uma distribuição aleatória dos pacientes infetados por dengue por várias faixas etárias. No entanto esta situação, que parece comum nos territórios europeus, difere do que parece acontecer noutras regiões. Resultados de estudos de seroprevalência efetuados na Ilha de Mayotte, em 2006 (Sissoko *et al.*, 2010), assim como na cidade do Recife no Brasil (Braga *et al.*, 2010), demonstraram um aumento da percentagem de participantes seropositivos com o aumento da faixa etária analisada. Esta diferença de resultados é facilmente explicada pelo contexto epidemiológico em que se realizaram os estudos mencionados. Em regiões endémicas como a ilha de Mayotte e Brasil, a probabilidade de um indivíduo contrair uma infeção por vírus de dengue está diretamente relacionada com o seu tempo de permanência em zonas de circulação ativa do vírus. Assim, quanto mais velho é o indivíduo, maior é a sua probabilidade de ter sido inoculado com o referido arbovírus, durante a refeição sanguínea de uma fêmea de mosquito infetada. Já em zona geográfica onde apenas se registou um surto epidémico da doença, limitado no tempo, qualquer pessoa que viva na zona de circulação do vírus terá uma determinada probabilidade de contrair uma infeção, probabilidade essa que, podendo não ser completamente aleatória,

nada parece ter a ver com a sua idade. Este facto, em zonas de surto único, só pode ser contrariado caso a população vetora do agente patogénico apresente uma marcada preferência trófica por hospedeiros humanos de uma classe etária específica. Desvios tróficos desta natureza não são comuns na família dos culicídeos, não existindo, na literatura pesquisada nenhum caso documentado (Clements, 1992). Outra opção é uma determinada faixa etária estar mais exposta, por questões circunstanciais, à picada do vetor o que não parece ter sido o caso da Ilha da Madeira.

Não parece também existir ligação entre o género e a probabilidade de contrair uma infeção por vírus da dengue como se verifica no gráfico 3. Estes resultados referentes ao género reforçam o que foi observado no estudo de Braga *et al.*, 2010 e em Succo *et al.*, 2016; estudos realizados em local endémico e epidémico respetivamente, demonstrando não haver diferenças na percentagem de seropositividade de acordo com os dois géneros do hospedeiro humano.

O peso dos participantes foi incluído neste estudo como parâmetro fisiológico (gráfico 4), mas até à data não houve outros estudos que o considerassem, sendo então estes resultados apenas um registo que sugere que não existe nenhuma ligação entre o peso dos participantes e uma maior probabilidade de contrair infeção por vírus da dengue.

No gráfico 5, sendo este uma representação gráfica da distribuição dos participantes seropositivos consoante estes tenham viajado ou não para países endémicos, constata-se que há uma maior prevalência de seropositivos naqueles que viajaram para países endémicos de dengue, mas esta diferença não é estatisticamente significativa. Assim pode-se concluir que, o número de pessoas que tenham contraído infeção pelo vírus da dengue fora da ilha da Madeira, em algum desses países endémicos, e as reações positivas falsas devido à possibilidade do participante ter contraído um outro flavivírus (e desta forma haver uma reação cruzada), não influencia significativamente o status imunológico da população madeirense em relação a esta arbovirose. Comparativamente, o estudo de Baaten *et al.*, (2011), este focado na percentagem de pacientes assintomáticos e sintomáticos que retornavam para a Holanda vindos de países endémicos, demonstra que de 1207 participantes, 14 obtiveram resultados positivos para dengue. No entanto, apenas 36% destes tiveram qualquer sintomatologia associada à dengue, conferindo assim um risco substancial de introdução

da dengue em países não endémicos devido à elevada taxa de casos de infeções assintomáticas que esta doença pode apresentar. Este risco estará também associado à percentagem de assintomáticos/sintomáticos existente em cada país endémico para dengue uma vez que uma taxa mais elevada de sintomáticos pode prevenir que estes casos passem despercebidos, logo um melhor controlo em relação a casos importados para países não endémicos.

A distribuição das amostras obtida no gráfico 6, permite verificar que o fator “tem/não tem vacina da febre-amarela” não mostrou qualquer interferência significativa nos resultados, uma vez que a maioria dos positivos obtidos não possui a dita vacina. Estes resultados demonstram também que as diferenças obtidas não são significativas para aqueles que têm a vacina. Num estudo denota-se que pessoas com a vacina da febre-amarela obtiveram baixa reatividade cruzada quando testadas para DENV-2 utilizando o teste de PRNT (Mansfield *et al.*, 2011). Assim, de acordo com o estudo acima citado, é possível que a presença de reatividade cruzada provocada pela vacina da febre-amarela esteja dependente do teste diagnóstico utilizado assim como do facto se o participante é originário de local endémico ou epidémico para dengue e outros flavivírus.

No gráfico 7 observa-se que o concelho de Porto Moniz foi o que apresentou, em proporção, mais amostras positivas, seguido de São Vicente e Ribeira Brava. Estimativas de seropositividade por mil habitantes de cada concelho dão resultados semelhantes (Porto Moniz=0,37; Funchal=0,205; São Vicente=0,175; Ribeira Brava=0,075; Santa Cruz=0,069 e Câmara de Lobos=0,028), mas estes resultados não podem ser considerados uma vez que não se obteve amostra representativa da população de todos os concelhos da Madeira. Dado que Porto Moniz e São Vicente se encontram no lado norte da ilha, estas amostras positivas, uma vez que o vetor ainda não afetou esta área da ilha, devem-se possivelmente ao facto dos participantes terem atividades profissionais na zona sul. Uma vez que o epicentro do surto de 2012 foi no centro da cidade do Funchal, seria de esperar que daí derivassem a maior percentagem de seropositivos em relação ao nº de participantes residentes nesta região, o que não foi comprovado neste estudo. Todavia, a maioria dos concelhos afetados estão de acordo com a dispersão do vírus da dengue ao longo do surto – pelo lado sul da ilha, uma vez que o mosquito vetor se encontra distribuído por toda essa zona. De sublinhar, que estes

resultados são apenas indicativos pois não foi possível obter uma amostra representativa para cada concelho em estudo.

Com base nos resultados obtidos durante este estudo foi possível estimar qual a proporção da população que terá sido realmente infetada ao longo do surto, consoante a sua faixa etária e género, como é possível constatar na tabela 7.

É de notar que a amostragem efetuada para a faixa etária dos 10-19 anos não foi considerada representativa da população uma vez que só se conseguiram obter 19 amostras quando eram necessárias 36.

Na interpretação da tabela 8, observa-se que a proporção de pessoas infetadas pelo surto de dengue de 2012 é consideravelmente mais elevada do que o esperado (para uma proporção de 20% sintomáticos e 80% assintomáticos, sabendo que 1080 casos foram confirmados durante o surto, então o número de casos estimados deveria ser de 5400) apresentando uma estimativa de 18974 casos para este surto. Fazendo a mesma proporção de assintomáticos/sintomáticos tendo em conta o número de casos prováveis, então de 2168 casos seria de esperar uma proporção de 10840, o que continua a ser um valor abaixo do que foi obtido. No entanto, a percentagem de casos de dengue assintomáticos parece variar significativamente mesmo entre países endémicos de dengue. Se para Bangkok a percentagem de assintomáticos estimada ronda os 87% (Burke *et al.*, 1988), num estudo efetuado em Singapura já esta percentagem desce para 78% (Yap *et al.*, 2013) e em Kamphaeng Phet, uma outra cidade tailandesa, a proporção de assintomáticos/sintomáticos é de 1,1:1, ou seja um pouco mais de 50% de casos assintomáticos (Endy *et al.*, 2002).

Por sua vez, Halstead (2006), observou uma grande variação na epidemiologia da dengue relativamente ao rácio febre da dengue/dengue grave, entre os valores obtidos nas Américas comparativamente aos obtidos no Sudeste Asiático, sendo que, estes valores são sugestivos relativamente à variação do rácio assintomáticos/sintomáticos a nível global. Esta variação pode dever-se à diferente informação genética da população que os torna mais ou menos suscetíveis a uma infeção por dengue, mas em diversos casos a variação deste rácio deve-se a: (i) diagnósticos errados, uma vez que a dengue, quando provoca sintomatologia ligeira, é facilmente confundida com outras patologias (*e.g.* malária); (ii) aos diversos serotipos que se encontram em circulação; (iii) situação epidemiológica (endémica/epidémica) do

local em estudo (Chastel, 2012), e ao seu nível socioeconómico que pode influenciar o acesso aos serviços de saúde.

## **5.2. Teste ELISA “Capture” para IgG**

Relativamente ao teste realizado para infeções secundárias, de acordo com a bula deste último “kit”, as cinco amostras com um resultado positivo sugerem infeções secundárias recentes uma vez que obtiveram “index-value” superiores a 2,2. Neste teste também se obtiveram quatro resultados indeterminados (como é possível verificar no gráfico 9), cujos “index-value” se encontram entre 1,8 e 2,2, sugerindo que os participantes que doaram estas amostras ou tiveram uma infeção secundária mais antiga, e o título de IgG é consideravelmente mais baixo, ou então tiveram infeções primárias com reações exacerbadas. As restantes amostras, com um resultado negativo mas com reação, consideram-se amostras com infeções primárias uma vez que o valor de “cut-off” para este “kit” é consideravelmente mais elevado do que o verificado no ELISA indireto para IgG. Todas as amostras sem reação podem-se considerar como negativas.

Das cinco amostras positivas, apenas um destes participantes viajou para países endémicos para dengue e outros flavivírus tendo também obtido a inoculação para a vacina da febre-amarela. O teste utilizado tem uma elevada sensibilidade e especificidade, e de acordo com a bula deste “kit”, uma reação positiva traduz-se numa infeção secundária recente. Dado que passaram três anos desde o início do surto (entre os quais o título de anticorpos duma eventual infeção secundária teria reduzido consideravelmente) até ao momento das colheitas, este resultado pode ser devido a vários fatores: (i) parte da população de mosquitos ter permanecido infetada e por transmissão vertical (funcionando como reservatório) deu continuidade a esta infeção às gerações seguintes, tendo mais tarde reinfetado alguma parte da população humana; (ii) existir a co-circulação na população humana e vetora de um outro *Flavivirus*; (iii) ter ocorrido novas re-introduções de DENV, de serotipo 1 ou outro, mas que não levou ao aparecimento de um novo surto e, finalmente: (iv) a possibilidade de, no caso da população da Madeira, os métodos de diagnóstico utilizados apresentarem níveis de especificidade e sensibilidade abaixo dos mencionados nas respetivas bulas. Visto que: (i) estudos de transmissão vertical (Parreira R., comunicação pessoal) e deteção viral em mosquitos adultos (INSA, 2015) não identificaram a presença de circulação de vírus no

vetor, nos anos subsequentes ao surto e que: (ii) no que se refere à circulação de *Flavivirus* no território do arquipélago, apenas um caso autóctone de Zika foi detetado pelo sistema de vigilância epidemiológica implementado pelas autoridades de saúde da Madeira, estes dados deverão ser confirmados por outros métodos laboratoriais, nomeadamente, com um teste de PRNT onde é possível fazer uma quantificação do título de anticorpos neutralizantes em circulação.

### **5.3. Teste ELISA “in-house”**

Com os dados verificados nas tabelas 5 e 6, constata-se que o novo antígeno testado não possui uma sensibilidade muito elevada para a deteção de IgGs anti-DENV no soro e na saliva de participantes seropositivos, demonstrando assim não ser o ideal como novo método de diagnóstico para a saliva como foi proposto no início deste trabalho. A diferença de resultados entre os dois tipos de amostras biológicas (soro e saliva) pode ser justificada pelo facto de o título de anticorpos na saliva ser muito inferior ao existente no soro. Ambos os testes (“kit” Panbio® e o teste ELISA “in-house”) demonstraram uma sensibilidade de 19% para a saliva. A especificidade só foi calculada para o ELISA “in-house” obtendo um resultado de 92%. Quando se comparou o teste “in-house” com o teste padrão ELISA indireto para IgG da Panbio®, duma maneira geral, este apresentou uma elevada especificidade, mas dado que existem outros testes-diagnóstico com uma maior sensibilidade e especificidade, este não apresenta nenhuma vantagem adicional às opções que já existem no mercado. Desta forma pode-se concluir que o antígeno em estudo poderia vir a ser melhorado possivelmente com uma melhor caracterização do epítipo em questão.

## **6. Conclusão**

Ao longo deste trabalho conseguiu-se ter uma noção mais próxima da real dimensão do surto de dengue de 2012 na ilha da Madeira, comprovando assim a elevada taxa de casos assintomáticos associados à infeção por DENV. Assim, partindo de uma base de 1080 casos diagnosticados laboratorialmente ao longo do surto, este trabalho permitiu estimar que *ca.* de 18974 pessoas terão, eventualmente, sido infetadas no decorrer deste surto. A idade, género, peso, imunização contra a febre-amarela e deslocações para países endémicos de dengue não se apresentaram como fatores relevantes para uma maior propensão a ser-se infetado pelo vírus da dengue neste estudo e dada a situação epidemiológica deste vírus na Madeira, demonstrando que esta infeção pode desenvolver-se em qualquer pessoa independentemente destes indicadores pessoais. De acordo com o gráfico 7 e figura 14, referentes à distribuição geográfica dos participantes deste estudo, permitiu concluir que a maioria dos seropositivos é originária dos concelhos do lado sul da ilha, como confirmado em Sousa *et al.*, (2012) Silva AC (comunicação pessoal), apesar de que, em proporção, não foram estes os concelhos com maior número de seropositivos/concelho. Uma vez que o mosquito vetor se encontra distribuído por toda a zona sul da ilha, especialmente na zona da cidade do Funchal, seria de esperar que todos os participantes seropositivos fossem originários ou tivessem atividades profissionais nesta zona. Assim, a monitorização entomológica e controlo vetorial através da eliminação de criadouros larvares devem ser mantidos, e face à presença de uma marcada resistência aos inseticidas na população local de *Ae. aegypti*, novas metodologias de controlo vetorial devem ser ponderadas. A disseminação de sal em possíveis criadouros, a utilização de novas formulações de biocidas larvares ou de larvicidas baseados em miméticos de hormonas de crescimento deverão ser analisadas e ponderadas em conjunto com a possível introdução de mosquitos transgénicos que limitem a capacidade de reprodução desta espécie na Madeira.

Este trabalho sugere que o vírus da dengue ainda se encontra em circulação na Ilha da Madeira, de acordo com os resultados obtidos com o “kit” de ELISA Capture para IgG. Mas uma vez que, até à data, apenas foi identificada a circulação de DENV, mesmo estando a ocorrer transmissão viral pós-surto, a proporção da população humana que já se encontra imunizada provavelmente limitará a possibilidade de ocorrência de

um novo surto de doença provocado por DENV-1. De referir que ambos os “kits” da PanBio® utilizados neste estudo são “kits” de natureza qualitativa, desta forma sugere-se que os resultados aqui apresentados sejam confirmados através de um teste quantitativo como por exemplo o teste PRNT (“Plaque Reduction Neutralization Testing”).

Relativamente ao estudo do novo teste ELISA “in-house”, foi demonstrado que o antígeno utilizado neste novo teste não é muito sensível para a deteção dos anticorpos contra o vírus da dengue. Embora tenha apresentado um nível elevado de especificidade em comparação com o teste padrão utilizado, é de referir que esta especificidade não foi avaliada com amostras biológicas provenientes de participantes seropositivos para outros *Flavivirus*. De salientar que mesmo com uma nova versão do teste, altamente sensível, será mandatário avaliar a especificidade do teste em amostras biológicas (soro e saliva) de pessoas seropositivas para outros *Flavivirus* de modo a avaliar os níveis de reatividade cruzada que o teste possa apresentar.

É de extrema necessidade continuar a melhorar os métodos de diagnóstico para dengue assim como para os *Flavivirus* que provocam doença em humanos. A sintomatologia associada à infeção por diferentes arbovírus é, frequentemente, semelhante tornando o diagnóstico clínico falível e comprometendo assim a vigilância epidemiológica destas patologias. A existência de um teste que utilizasse amostras biológicas de simples colheita (saliva) não só agilizaria o diagnóstico laboratorial como facilitaria a realização de rastreios imunológicos pós-epidemias que auxiliariam a compreensão da dinâmica imunológica/epidemiológica desta doença.

Atualmente, já existe uma vacina licenciada para aplicação em larga escala no Brasil. Esta é uma vacina tetravalente baseada numa quimera de vírus da febre-amarela com a proteína do invólucro dos quatro tipos de serotipos do vírus da dengue, que apresentou nos ensaios clínicos de fase III uma proteção de 60% contra todos os serotipos e 80% de eficácia contra formas graves da doença que requerem hospitalizações e com uma maior eficácia a partir dos nove anos de idade. Assim, esta vacina pode ser uma boa forma de evitar eventuais novos surtos da doença na ilha da Madeira, imunizando aqueles que foram infetados no primeiro surto de forma a evitar-se formas graves da dengue e fazendo um plano de vacinação para crianças acima dos nove anos. Mas como ainda é uma vacina recentemente desenvolvida existem diversos



fatores ainda desconhecidos, nomeadamente a sua eficácia em zonas não endémicas como é o caso da ilha da Madeira.

## **7. Referências bibliográficas**

- 2º Congresso Nacional de Medicina Tropical – Anais, Vol.12, 2013. [online] Disponível em: <http://ihmtweb.ihmt.unl.pt/PublicacoesFB/Anais/Anais2013-vol12-2CNMT/index.html#49/z> [Acedido em 10 Jun. 2016].
- Alameida, A.P.G., Galão, R.P., Sousa, C.A. et al. 2008. Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Trans R Soc Trop Med & Hyg*;102: 823-832
- Almeida A.P.G. 2011. Os mosquitos em Portugal século XX, *Acta Med Port.* 24(6):961-974
- Alves, M.J. et al., 2013. Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(6), pp.3–6.
- Baaten, G.G.G., Sonder, G.J.B., Zaaijer, H.L., van Gool, T., Kint, J.A.P.C.M., van den Hoek, A. 2011. Travel-related Dengue Virus Infection, the Netherlands, 2006–2007. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5): 821–828
- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoens, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., William Wint, G.R., Simmons, C.P., Scotts, T.W., Farrar, J.J., Hay, S.I., 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, pp. 504-507

- Braga, C., Luna, C.F., Martelli, C.,M., de Souza, W.V., Cordeiro, M.T., Alexander, N., Albuquerque, M.F.M., Júnior, J.C.S., Marques, E.T. 2010. Seroprevalence and risk factors for dengue infection in socioeconomically distinct areas of Recife, Brazil. *Acta tropica*, [online] 113(3), p. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3847853/>
- Brès, P.L.J. 1987. Un siècle de progrès dans la lutte contre la fièvre jaune. *Bull World Health Organ*;65:149-160
- Burke, D.S., Nisalak, A., Johnson, D.E., Scott, R.M. 1988. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38(1), 1988, pp. 172-180 (87.222)
- Cassadou, S., Boucau, S., Petit-Sinturel, M., Huc P., Leparç-Goffart I., Ledrans, M. 2014. Emergence of chikungunya fever on the french side of Saint Martin Island, October to December 2013. *Eurosurveillance*, 19(13), Article 2
- Chastel, C. 2012. Eventual Role of Asymptomatic Cases of Dengue for the Introduction and Spread of Dengue Viruses in Non-Endemic Regions. *Frontiers in Physiology*, [online] 3, p. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3315825/>
- Christophers, S.R., 1960. *Aedes aegypti (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure*, London, UK: Cambridge University Press.
- Clements, A.N., 1992. *The Biology of Mosquitoes: Development Nutrition and Reproduction Volume 1*
- Connel, J., McKeeown, P., Garvey, P., *et al.* 2004. Two linked cases of West Nile virus (WNV) acquired by Irish tourists in the Algarve, Portugal. *Euro Surveill*;8, 05/08/2004.

- Costa, L., Queiroz, J.S., Rêes J.F. 1956. Notas sobre um trabalho de prospecção entomológica na cidade de Lisboa e arredores. *Boletim dos Serviços de Saúde Pública*; vol III:7-40
- DGS, 2013. Dengue na Ilha da Madeira - situação em 01 de setembro de 2013. *Informação mensal sobre dengue na Ilha da Madeira*, p.1. Available at: [http://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-2013/dengue-madeira-situacao-em-2013\\_09\\_01-pdf.aspx](http://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-2013/dengue-madeira-situacao-em-2013_09_01-pdf.aspx) [Acedido em 24 de Maio de 2016].
- Ding, X., Hu, D., Chen, Y., Di, B., Jin, J., Pan, Y., Qiu, L., Wang, Y., Wen, K., Wang, M., Che, X., 2011. Full Serotype- and Group-Specific NS1 Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Rapid Differential Diagnosis of Dengue Virus Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(3) p. 430–434
- Dussart, P., Labeau, B., Lagathu, G., Louis, P., Nunes, M., Rodrigues, S., Storck-Herrmann, C., Cesaire, R., Morvan, J., Flamand, M. and Baril, L. 2006. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(11), pp.1185-1189.
- Ecdc.europa.eu. (2016). [online] Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/dengue-madeira-ECDC-mission-2013.pdf> [Accessed 29 Aug. 2016].
- Ecdc.europa.eu. (2016). Factsheet for health professionals . [online] Available at: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/dengue\\_fever/factsheet-for-health-professionals/Pages/Factsheet\\_health\\_professionals.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/dengue_fever/factsheet-for-health-professionals/Pages/Factsheet_health_professionals.aspx) [Accessed 7 Sep. 2016].

- Endy, T., Chunsuttiwat, S., Nisalak, A., Libraty, D., Green, S., Rothman, A., Vaughn, D. and Ennis, F. 2002. Epidemiology of Inapparent and Symptomatic Acute Dengue Virus Infection: A Prospective Study of Primary School Children in Kamphaeng Phet, Thailand. *American Journal of Epidemiology*, 156(1), pp.40-51. Available at: <http://aje.oxfordjournals.org/content/156/1/40.long>
- Esteves, A., Almeida, A.P.G., Galão, R.P. *et al.* 2005. West Nile Virus in Southern Portugal, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis*;5:410-3
- Fernandes, T., Clode, M.H.H., Simões, M.J., Ribeiro, H., Anselmo, M.L. 1998. Isolation of virus West Nile from a pool of unfed *Anopheles atroparvus* females in the Tejo River estuary, Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*;5:7
- Filipe, A.R., Pinto, M.R. 1969. Survey for antibodies to arboviruses in serum of animals from southern Portugal. *Am J Trop Med Hyg*; 18: 423-6
- Filipe, A.R. 1972. Isolation in Portugal of West Nile virus from *Anopheles maculipennis* mosquitoes. *Acta Virol*;16:361-7
- Filipe, A.R., Sobral, M., Campaniço F.C. 1973. Encefalomyelite equina por arbovírus. A propósito de uma epizootia presuntiva causada pelo vírus West Nile. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*;68:90-101
- Filipe, A.R., Andrade, H.R. 1990. Arboviruses in the Iberian Peninsula. *Acta Virol* ;34: 582-591
- Gonçalves, Y., Silva, J. & Biscoito, M., 2008. On the presence of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Insecta, Diptera, Culicidae) in the Island of Madeira (Portugal). *Bol. Mus. Mun. Funchal*, 58(322), pp.53–59.
- Gubler, D.J., 2011. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Tropical medicine and health*, 39(4 Suppl), pp.3–11.

Guzman, Maria G., Halstead, Scott B., Artsob, Harvey; Buchy, Philippe; Farrar, Jeremy; Gubler, Duane J., Hunsperger, Elizabeth; Kroeger, Axel; Margolis, Harold S., Martínez, Eric; Nathan, Michael B., Pelegrino, Jose Luis; Simmons, Cameron; Yoksan, Sutee; Peeling, Rosanna W. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), pp.S7-S16

Guzman, M.G., Harris, E. 2015. Dengue. *Lancet* 385: 453–465

Halstead, S.B. 2006. Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do they differ? *Rev Panam Salud Publica* (6):407–15.

Holstein, M., 1967. Dynamics of *Aedes aegypti* distribution, density and seasonal prevalence in the Mediterranean area. *Bulletin of the World Health Organization*, 36(4), pp.541–3.

Houghton-Triviño, N., Montaña, D. and Castellanos, J. 2008. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Revista de Salud Pública*, 10(2), pp.299-307.

Hunsperger, E., Yoksan, S., Buchy, P., Nguyen, V., Sekaran, S., Enria, D., Pelegrino, J., Vázquez, S., Artsob, H., Drebot, M., Gubler, D., Halstead, S., Guzmán, M., Margolis, H., Nathanson, C., Lic, N., Bessoff, K., Kliks, S. and Peeling, R. 2009. Evaluation of Commercially Available Anti–Dengue Virus Immunoglobulin M Tests. *Emerg. Infect. Dis.*, 15(3), pp.436-440.

INE 2014. Estatistica.gov-madeira.pt. (2016). [online] Disponível em: <http://estatistica.gov-madeira.pt/index.php/download-now/social/popcondsoc-pt/demografia-pt/demografia-noticias-pt/542-16-06-2015-em-2014-a-populacao-residente-na-ram-continua-a-diminuir> [Acedido a 4 Oct. 2016].

Informação mensal sobre dengue na Ilha da Madeira, DGS. 2015

- Innis, B., Nisalak, A., Nimmannitya, S., Kusalerdchariya, S., Chongswasdi, V., Suntayakorn, S., Puttisri, P. and Hoke, C. 1989. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Characterize Dengue Infections Where Dengue and Japanese Encephalitis Co-Circulate. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, [online] 40(4), pp.418-427.
- INSA, 2015. Boletim Epidemiológico\_N13\_julho-setembro\_2015. Disponível em: [http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/3098/3/Boletim\\_Epidemiologico\\_Observacoes\\_N13\\_julho-setembro\\_2015.pdf#page=7](http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/3098/3/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_N13_julho-setembro_2015.pdf#page=7). Acedido em 7 Out. 2016
- Johnson, B. W., Russell, B. J. & Lanciotti, R. S., 2005. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4977–4983
- Jorge, R., Sarmiento, M.M.M. La malaria em Portugal. *Annaes de Saude Publica do Reino III*:1-23
- Klungthong, C., Gibbons, R., Thaisomboonsuk, B., Nisalak, A., Kalayanaroj, S., Thirawuth, V., Nutkumhang, N., Mammen, M. and Jarman, R. 2007. Dengue Virus Detection Using Whole Blood for Reverse Transcriptase PCR and Virus Isolation. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), pp.2480-2485.
- La Ruche, G., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Desprès, P., Lenglet, A., Jourdain, F., Leparc-Goffart, I., Charlet, F., Ollier, L., Mantey, K., Mollet, T., Fournier, J.P., Torrents, R., Leitmeyer, K., Hilaiet, P., Zeller, H., Van Bortel, W., Dejour-Salamanca, D., Grandadam, M., Gastellu-Etchegorry, M. 2010. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill*ance, 15(39):19676.

- Lukman, N., Salim, G., Kosasih, H., Susanto, N., Parwati, I., Fitri, S., Alisjahbana, B., Widjaja, S. and Williams, M. (2016). Comparison of the Hemagglutination Inhibition Test and IgG ELISA in Categorizing Primary and Secondary Dengue Infections Based on the Plaque Reduction Neutralization Test. *BioMed Research International*, 2016, p. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/5253842/>
- Mansfield, K. L., Horton, D. L., Johnson, N., Li, L., Barrett, A. D. T., Smith, D. J., Galbraith, S. E., Solomon, T., Fooks, A. R. 2011. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 12), 2821–2829. <http://doi.org/10.1099/vir.0.031641-0>
- Matsui, K., Gromowski, G., Li, L. and Barrett, A. (2010). Characterization of a dengue type-specific epitope on dengue 3 virus envelope protein domain III. *Journal of General Virology*, 91(9), pp.2249-2253.
- Morbidity and Mortality Weekly Report (*MMWR*), CDC. 06 Junho 2014
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., Cao-Lormeau, V.M., 2015. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases Journal*, **21**(2).
- Mustafa, M., Rasotgi, V., Jain, S. and Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1), pp.67-70.
- Parreira, R., Severino, F., Freitas, F., Piedade, J., Almeida, A.P.G., Esteves, A., 2007. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. October 2007, 7(3): 344-352. doi:10.1089/vbz.2006.0632



- Peeling, R., Artsob, H., Pelegrino, J., Buchy, P., Cardoso, M., Devi, S., Enria, D., Farrar, J., Gubler, D., Guzman, M., Halstead, S., Hunsperger, E., Kliks, S., Margolis, H., Nathanson, C., Nguyen, V., Rizzo, N., Vázquez, S. and Yoksan, S. 2010. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), pp.S30-S37.
- Pierson, T.C., Sánchez, M.D., Puffer, B.A., Ahmed, A.A., Geiss, B.J., Valentine, L.E., Altamura, L.A., Diamond, M.S., Doms, R.W. 2006. A rapid and quantitative assay for measuring antibody-mediated neutralization of West Nile virus infection. *Virology*. 2006 Mar 1;346(1):53-65.
- Powell, J. and Tabachnick, W. 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 108, pp.11-17.
- Ribeiro, H., Da Cunha Ramos, H., Pires, C.A., Antunes Capela, R. 1988. An annotated checklist of the mosquitoes of continental Portugal (Diptera, Culicidae). In *Actas do III Congresso Iberico de Entomologia*. Granada, pp. 233–254.
- Sarmiento, M., França, C. 1902. “Sur quelques Culicides portugais”. *Compt. Rend. Hebd. Séance et Memoires de la Societé de Biologie* 54:152-3
- Seixas, G., 2012. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) da ilha da Madeira: origem geográfica e resistência aos insecticidas. Tese de Mestrado, IHMT, Universidade Nova de Lisboa.
- Seixas, G., Salgueiro, P., Silva, A., Campos, M., Spenassatto, C., Reyes-Lugo, M., Novo, M., Ribolla, P., Pinto, J. and Sousa, C. 2013. *Aedes aegypti* on Madeira Island (Portugal): genetic variation of a recently introduced dengue vector. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 108, pp.3-10.

- Shrestha B., Brien J.D., Sukupolvi-Petty S., Austin S.K., Edeling M.A., Kim T., O'Brien K.M., Nelson C.A., Johnson S., Fremont D.H., Diamond M.S., 2010. The Development of Therapeutic Antibodies That Neutralize Homologous and Heterologous Genotypes of Dengue Virus Type 1. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000823
- Sissoko, D., Ezzedine, K., Giry, C., Moendandzé, A., Lernout, T., D'Ortenzio, E., Pettinelli, F. and Malvy, D. 2010. Seroepidemiology of Dengue Virus in Mayotte, Indian Ocean, 2006. *PLOS ONE*, [online] 5(11), p.e14141. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014141>
- Sousa C.A., Clairouin M., Seixas G., Viveiros B., Novo M.T., Silva A.C., Escoval M.T., Economopoulou A. 2012. Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: preliminary report. *Euro Surveillance*, 17(49):pii=20333
- Succo, T., Leparç-Goffart, I., Ferré, J., Roiz, D., Broche, B., Maquart, M., Noel, H., Catelinois, O., Entezam, F., Caire, D., Jourdain, F., Esteve-Moussion, I., Cochet, A., Paupy, C., Rousseau, C. and Paty, M. 2016. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, South of France, July to September 2015. *Eurosurveillance Edition 2016: Volume 21 / Article 2*
- TDR/WHO. 2009. Evaluation of commercially available antidengue virus immunoglobulin M tests. Diagnostics Evaluation Series No.3 [online] <<http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/diagnosticsevaluation-3/pdf/diagnostics-evaluation-3.pdf>> (TDR/WHO, Geneva. Switzerland).
- Vazquez S., Hafner G., Ruiz D., Calzada N., Guzman M.G. 2007. Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio

kits for diagnostic dengue infections. *J Clin Virol.*;39(3):194–8. doi: 10.1016/j.jcv.2007.04.003.

Viralzone.expasy.org (2016). ViralZone: Flavivirus. [online] Available at: [http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/24.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/24.html) [Accessed 19 May 2016].

Weaver S.C., Vasilakis N., 2009. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution* 9 523–540

White L.A., 1987. Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 Cells to Viral Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(7), pp. 1221-1224

Whitehead, S. S., Blaney, J.E., Durbin, A.P., Murphy, B.R. 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology* 5, 518–528

WHO. 2009. Dengue Guidelines For Diagnosis, Treatment, Prevention And Control. ISBN 978 92 4 154787 1

WHO, 2012 - Handbook of clinical management of dengue. Geneva, World Health Organization, Geneva, Suíça.

WHO | Zika vírus, 2016. WHO | Zika vírus. [ONLINE] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/> [Acedido em 28 de Janeiro 2016] [http://www.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/IR/Viral\\_Diseases/Zika-Virus/2016-cha-autoch-human-cases-zika-virus-ew-3.jpg](http://www.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/IR/Viral_Diseases/Zika-Virus/2016-cha-autoch-human-cases-zika-virus-ew-3.jpg) [Acedido em 28 de Janeiro 2016]

Yap, G., Li, C., Mutalib, A., Lai, Y.L., Ng, L.C. 2013 . High Rates of Inapparent Dengue in Older Adults in Singapore. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), p.1065.

ZELLER HG, SCHUFFENECKER I. 2004. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;23:147-156

# **Anexo I**

## **CONSENTIMENTO INFORMADO ESTUDO DA SEROPREVALÊNCIA DO VÍRUS DA DENGUE FICHA INFORMATIVA PARA PARTICIPANTES DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR**

Vimos por este meio solicitar a sua participação num estudo científico sobre Dengue. Serve o presente termo de consentimento para lhe dar a informação necessária para o ajudar a decidir se deseja fazer, ou não, parte do estudo. Por favor, leia o termo de consentimento de forma cuidada. Pode levantar questões acerca do objetivo do estudo, o que incentivamos a que o faça, os riscos possíveis e benefícios, os seus direitos como voluntário e/ou qualquer assunto ao qual não esteja esclarecido. Quando todas as suas questões tiverem sido respondidas, pode decidir então se quer ou não participar no estudo. Este processo denomina-se “consentimento informado”.

### **INTRODUÇÃO AO ESTUDO**

A febre de Dengue é causada por um vírus que é transmitido por picadas de mosquito. Pode ser uma patologia grave tanto para crianças como para adultos. Não há uma vacina contra este e ainda há pouco entendimento acerca da doença. Entre Setembro de 2012 e Março de 2013, a Ilha da Madeira sofreu um surto de febre de Dengue com mais de 2000 casos. Contudo, várias infeções podem ser assintomáticas, ou apresentarem sintomas muito ligeiros.

### **RISCOS E BENEFÍCIOS**

Esta recolha não apresenta nenhum risco para o participante.

Como benefícios, uma amostra de sangue dá-nos uma leitura mais sensível a uma exposição anterior ao Dengue, mas esperamos encontrar uma correlação com a saliva para permitir que estudos futuros possam ser feitos apenas com amostras de saliva.

Os resultados dos testes ser-lhe-ão fornecidos, se assim o desejar. No entanto, salientamos a importância médica de conhecer se esteve ou não exposto/a ao vírus da Dengue caso de, no futuro, voltar a estar numa área de transmissão de Dengue.

Este estudo refere-se apenas à dengue mas as amostras serão preservadas para possíveis estudos futuros referentes a outras doenças que necessitem de amostras de sangue e saliva. No entanto, após a comunicação do resultado do estudo sobre a dengue (se assim o desejar) as amostras serão anonimizadas irreversivelmente (sem identificação do dador) e só estarão disponíveis para

futuros estudos durante um período máximo de cinco anos. Após este período todas as amostras serão destruídas.

**OBJETIVO** Este estudo vai-nos ajudar a validar um novo teste que auxiliará a deteção da dengue através da saliva (em vez de sangue, como acontece atualmente) e permitirá às autoridades de saúde ter uma ideia da extensão da epidemia de dengue, incluindo pessoas que estiveram doentes mas que não apresentaram sintomas. Pedimos-lhe que doe uma amostra de saliva e de sangue para se testar se foi ou não exposto ao vírus de Dengue.

**COMO É QUE PODE PARTICIPAR NO ESTUDO?** Se decidir que quer participar no estudo, iremos pedir-lhe que assine o termo de consentimento.

**RECUSA EM PARTICIPAR** Como mencionado, pode recusar-se participação neste estudo, sem qualquer consequência negativa.

**CONFIDENCIALIDADE** Iremos manter a sua informação privada. O seu nome não constará nos resultados dos testes, nem em qualquer base de dados. Os seus dados pessoais serão codificados com um número que será utilizado em vez do seu nome. O seu nome não será mencionado nos artigos e discursos acerca do estudo.

**CUSTOS** Não haverá custos para si nem irá receber qualquer valor monetário por se juntar ao estudo.

**QUESTÕES** Se tiver mais algumas questões acerca do estudo, por favor questione o pessoal que o está a entrevistar.

**FORMULÁRIO DO CONSENTIMENTO INFORMADO**  
**ESTUDO DA SEROPREVALÊNCIA DO VÍRUS DA DENGUE**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO DE UM PARTICIPANTE**

Pessoa responsável e Instituição:

**Número de identificação do participante:**

Data do consentimento (dia/mês/ano) \_\_\_\_\_

Eu \_\_\_\_\_ (Sr./ \_\_\_\_\_ Sra.)

\_\_\_\_\_  
Pai/Mãe/Guardião de \_\_\_\_\_ (nome da criança)

Li a ficha informativa e o termo de consentimento. Também fui informado/a sobre o objetivo/metodologia do estudo, possíveis riscos e benefícios que podem ocorrer dada a minha participação no estudo, de forma satisfatória.

*Por favor assinale com ☐ no local apropriado que esteja de acordo com o que entendeu e concorda.*

- ☐ Fui totalmente informado dos possíveis riscos e benefícios ao participar neste estudo.
- ☐ Concordo em participar neste estudo acerca da exposição ao dengue.

Li e percebi todas as declarações deste termo de consentimento antes de assinar com o meu nome.

Assinatura: \_\_\_\_\_

(participante ou familiar/guardião se se tratar de uma criança)

Assinatura: \_\_\_\_\_ (investigador/testemunha só se aplica se o participante ou responsável do menor de idade for iletrado)

## Anexo II

IASAUDEDENGUESEROCONV CRF

IDNUM

Estudo da Seroprevalência

Responsável principal \_\_\_\_\_ Ass: \_\_\_\_\_

A zona cinzenta deste questionário contém dados anonimizados; apenas estes dados serão inseridos na base de dados eletrónica.

A preencher pelo responsável principal	VALIDAÇÃO
Nome _____	IDNUM <input type="text"/> (participante)
Apelidos _____	
Morada residência* _____	
_____	
Data nascimento** <input type="text"/>	D.NASC <input type="text"/>
Sexo <input type="text"/> (masculino - 1, feminino - 2)	SEXO <input type="text"/>
Peso (kg) <input type="text"/>	PESO <input type="text"/>
Vacina Febre-amarela <input type="text"/> (sim -1, não - 2)	VAC.FA <input type="text"/>
Vacina Encefalite Japonesa <input type="text"/> (sim -1, não - 2)	VAC.EJ <input type="text"/>
História anterior de suspeita de dengue <input type="text"/> (sim -1, não - 2)	SUSP.DEN <input type="text"/>
Se sim, em que ano _____	ANO.SUSP.DEN <input type="text"/>
Confirmação laboratorial de Dengue <input type="text"/> (sim -1, não - 2)	CONF.DEN <input type="text"/>
Método laboratorial de confirmação _____ (ELISA; RT-PCR; não sabe)	MÉTODO.CONF <input type="text"/>
Viagens para áreas endémicas de Dengue <input type="text"/> (sim -1, não - 2)	VIAGEM <input type="text"/>
Se sim, em que ano/País _____	ANO/LOCAL <input type="text"/>
<u>Consentimento informado assinado</u> <input type="text"/> (sim -1, não - 2)	CONST.INF.ASS <input type="text"/>

\* Residência permanente do participante

\*\* Data = DIA/MÊS/ANO

NOTAS:

---



---



---



## **Anexo III**

### **Protocolo ELISA in-house:**

#### **Reagentes utilizados:**

- PBS 1X (pH 7.4) (PBS comercial, eg: Sigma® ref: P 4417)
- PBS-T (0,1% Tween 20)
- PBS-T-NDM (0,5% Tween 20 + 5% de leite magro em pó)
- Antígeno recombinante ED3DENV1 (0,7mg/mL) a uma concentração final de 0,3µg/mL.
- Conjugado: Peroxidase IgG Anti-humano (Sigma®, ref A 0293)
- Substrato TMB (Tetra Methyl Benzidine) (Sigma®, ref: T 8665)
- Controlos negativos (soro de um participante não infetado por dengue)
- Água destilada
- Ácido Sulfúrico a 0,5M
- Antígeno recombinante utilizado: ED3-DENV1 desenvolvido pelo Institut Pasteur.

#### **Procedimento experimental:**

##### **Dia 1**

- Lavar a placa 4 vezes com PBS 1X;
- Dispensar nos poços da placa de ELISA 100µL de antígeno recombinante diluído;
- Cobrir a placa com película aderente e incubar durante a noite a 4°C.

##### **Dia 2**

- Bloquear a placa com 100 µL de PBS-T-NDM;
- Incubar a placa durante 1h a 37°C;
- Lavar 4 vezes com PBS-T;
- Controlo positivo feito em duplicado por placa: duas amostras em duplicado. Controlo negativo para uma placa: 6 amostras em duplicado. Brancos: 8 poços da placa com:

aplicação do antígeno recombinante nos poços -> bloqueio da placa -> adição de 100µL de PBS-T-NDM mas nenhum soro ou saliva diluídos -> Adição do conjugado -> Adição do TMB -> Parar a reação e fazer a leitura da absorvância;

- Dispensar 100µL dos controles positivos e negativos diluídos 1:100 em PBS-T-NDM para cada placa;

- Dispensar 100µL/poço de soro diluído em PBS-T-NDM 1:100 em duplicado (32 amostras positivas + 10% negativos (36 amostras));

OU

- Dispensar 100µL/poço de saliva diluída 1:2 em PBS-T-NDM;

- Cobrir e incubar a placa durante 1h a 37°C;

- Lavar 4 vezes com PBS-T;

- Dispensar 100µL/poço de peroxidase IgG anti-humano diluída 1:1000 em PBS-T-NDM;

- Cobrir e incubar durante 1h a 37°C;

- Lavar 4 vezes com PBS-T;

- Dispensar 100µL/poço de substrato TMB;

- Incubar à temperatura ambiente entre 10 a 15 minutos;

- Ler a absorvância a 450nm depois de parar a reação com 100µL de ácido sulfúrico/poço.